

(19) The Korean Intellectual Property Office (KR)**(12) Patent Publication of Application (A)**

(51) Int. Cl. ⁷ (11)

Patent Publication No: 2001-0063153

CO7H 21/00 (43)

Date of Publication of Application: 7.9.2001

(21) Application Number: 10-1999-0060032

(22) Date of Application: 12.21.1999

(71) Applicant: Genexin Corporation

Yu Souk Seo

Department of Life Science, Pohang University of Science and
Technology, Hyooja-dong, Nam-gu, Pohang-shi, Kyongsangbuk-do

(72) Inventor: Young Chul Sung

Professor Apartment 6-902, Jigok-dong, Nam-gu, Pohang-shi,
Kyongsangbuk-do

Seung Woo Lee

Male Dormitory 11-110, Jigok-dong 756, Nam-gu, Pohang-shi,
Kyongsangbuk-do

Man Ki Song

Graduate School Apartments 4-1103, Jigok-dong, Nam-gu,
Pohang-shi, Kyongsangbuk-do

Kwan Hyuck Baek

48-1 Hak Ik-dong, Nam-gu, Kwang Yok-shi, Incheon

(74) Representative: Won Hwe Yi

Review Request: Yes

(54) Phosphodiester CpG oligodeoxynucleotide plasmodium conjugated with a dG run, having strengthened immunoregulatory capabilities and increased safety

Summary

The present invention relates to a CpG oligodeoxynucleotide plasmodium with increased immunoregulatory capabilities; more specifically, it relates to a CpG oligodeoxynucleotide plasmodium which, through the conjugation of a run of deoxyriboguanosine (dG) to the 3' terminus of a CpG oligodeoxynucleotide having immunoregulatory capabilities, improves specific bindability to immune cells possessing SR (scavenger receptors), and, while maximizing Th-1 immunoactivity, also provides a CpG ODN which avoids inducing toxicity in vivo. The above-mentioned DpG ODN conjugated with a dG run is not only usable as an immunotherapy agent in the treatment of allergies, asthma, autoimmune disease, etc., but may also be usefully utilized as a vaccine adjuvant in the prevention and treatment of such infectious diseases as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and chronic hepatitis C.

Representative Drawings

Figure 4a

Specifications

Brief Explanations of Drawings

Drawing 1 is a graph showing the effects of CpG ODN conjugated with a dG run on the secretion of IL-12 from a macrophage (Drawing 1a), and a B cell (Drawing 1b).

Drawing 2 is a graph showing the efficacy of cytokine secretion according to the length of the dG run conjugated to the 3' terminus.

Drawing 3a is a graph showing the extent to which the ODN conjugated with a dG run binds to the surface of the dendritic cell.

Drawing 3b is a graph showing the extent to which the ODN conjugated with a dG run is internalized into the inner portion of the dendritic cell.

Drawing 3c shows the results of investigating how ODN conjugated with a dG run is internalized into the cell via a cell surface scavenger receptor, by means of a combined competitive binding analysis utilizing SR-A ligands dG₂₀, fucoidan, dextran sulphate and SR-BI ligand LDL, CD36 ligand oleic acid, as well as Mac-1 ligands fibrinogen and anti-CD18 monoclonal antibodies.

Drawing 4a shows the results of the investigative measurement of the amount of immunoglobulin relative to whether or not dG run induces Th-1 immunoreactivity in vivo, by inducing immunoreactions under conditions in which ODN conjugated with a dG run together with an HIV particle is contained, as well as under conditions in which it is not so contained.

Drawing 4b indicates the results of ELISA measurements of anti-E2 IgG2a titer following the muscular injection to mice of 1826D and 1826T, as well as the proteins M21 and gDE2t.

Drawing 4c is a graph showing the effects on cytokine (IL-4 and IFN- γ) secretion from the CD4⁺T cells of mice immunized with multiple ODN and gDE2t protein.

Detailed Explanation of the Invention

Purpose of the Invention

Technology of the Invention and Prior Art

The present invention relates to a CpG oligodeoxynucleotide plasmid with increased immunoregulatory capabilities; more specifically, it relates to a CpG oligodeoxynucleotide plasmid which, through binding of a deoxyriboguanosine (dG) run to the 3' terminus of a CpG oligodeoxynucleotide having immunoregulatory capabilities, improves specific bindability relative to immune cells possessing scavenger receptors (below, SR), and, while

maximizing helper T cell type 1 (Th-1) immunoactivity, also provides a CpG ODN which avoids inducing toxicity in vivo, and which is useful as a vaccine adjuvant and immunotherapy agent.

The CpG oligodeoxynucleotide (oligonucleotide; herein called CpG ODN) has become known as a useful immunoregulatory agent which is capable of activating all congenital and acquired immunoreactions. Specifically, the CpG ODN activates antigen presenting cells (below, APCs), such as, for example, B cells, macrophages, and dendritic cells; the fact of the manifestation of the secretion of cytokine, important in immune strengthening, as well as the concurrent expression of the co-stimulatory molecule, has become clear through organic experimentation (Klinman, D.M. et al., PNAS USA 93, 2879-2883, 1996; Krieg, A.M. et al., Nature 374, 546-549, 1995; Jakob, T. et al., J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998; Sparwasser, T. et al., Eur. J. Immunol. 28, 2045-2054, 1998). With the CpG ODN, internalization is produced through the endosome of the APC, and maturation of the endosome essentially becomes demanded through this activity. However, in order to induce the effectiveness of CpG ODN immune strengthening, the detailed mechanism relative to which process signal transmission goes through, or what constitutes the molecule in vivo which recognizes the CpG sequence of the ODN, is not yet understood.

On the other hand, due to the short length of the oligonucleotide, the CpG ODN easily degrades and loses its activity, based on the abundant amount of DNase (nuclease) existing in vivo. In order to solve this problem, a method which transforms the CpG ODN backbone by means of phosphorothioate binding (phosphorothioate backbone) has been utilized (Stein, C.A. & Cheng, Y.C. Science 261, 1004-1012, 1993). With this method, the level of resistance against DNase was high with phosphorothioate binding as compared to existing phosphodiester binding (phosphodiester backbone), and properties were utilized which increased the half life of the CpG ODN in vivo. However, recent studies have reported the fact that the phosphorothioate backbone itself strongly induces nonspecific immunoactivity in vivo, and that this elicits toxicity in vivo (Monteith, D.K. et al., Toxicol. Pathol. 27, 307-317, 1999; Wagner, H. Adv. Immunol. 73, 329-368, 1999); these studies indicate problems relative to safety with methods that transform the CpG ODN backbone through phosphorothioate binding.

Considering the situation stated above, the inventors of the present invention conducted investigation of a new CpG ODN plasmid with capabilities for minimizing harmful nonspecific immunoreactions in vivo while maximizing immunoactivity; as a result, they discovered that, if a prescribed length of a continuous sequence of deoxyriboguanosine (dG run) becomes conjugated to the 3' terminus of phosphodiester CpG ODN, not only does this render possible the specific communication of immune cells in expressing scavenger receptors (herein, SR), together with B cells, macrophages, and dendritic cells, but also that the immunoreactivity of helper T cells (Th-1) may be maximized in vivo, while, nonspecific immunoreactivity that exhibits toxicity in vivo may be separately minimized, differently from phosphorothioate binding, due to the control of CpG ODN degradation from DNase. The inventors thereby completed the present invention.

Problems that the Invention is to Solve

The purpose of the present invention is to provide a Phosphodiester CpG ODN plasmid which minimizes toxic nonspecific immunoreactions in vivo, while maximizing Th-1 immunoactivity.

Moreover, the purpose of the present invention is to provide a CpG ODN plasmid with increased capability for specific binding to immune cells which possess SR.

In addition, the purpose of the present invention is to provide usefulness in utilizing the above-mentioned CpG ODN plasmid as a vaccine adjuvant and as an immunotherapy agent.

Structure and Operation of the Invention

In order to achieve the above-stated purposes, the present invention provides a phosphodiester oligodeoxynucleotide (below, "ODN") plasmid which possesses a CpG motif, characterized by being conjugated with a continuous sequence of deoxyriboguanosine (dG run) to the 3' terminus.

Moreover, the present invention provides a CpG ODN plasmid which has the base

sequence numbers 2, 9, 14, 16, and 18, which specifically induces the immunoactivity of Th-1 within the CpG ODN conjugated with the above-mentioned dG run.

In addition, the present invention provides usefulness in utilizing the above-mentioned CpG ODN conjugated with the dG run as a vaccine adjuvant and as an immunotherapy agent.

The invention is explained in detail below.

In the present invention, "ODN" refers to an oligodeoxynucleotide of a 11~26 nt length which is capable of activating an immunoreaction; in particular, "CpG ODN" refers to an oligodeoxynucleotide which has a CpG motif (5' Purine Purine Cpg Pyrimidine Pyrimidine 3') that exhibits immunoregulatory capability.

"dG run" is a term used to describe the form in which 4 or greater deoxyriboguanosine become connected to CpG ODN by means of phosphodiester binding in a continuous manner.

In the present invention, the p19 sequence is [provided] through the origination in genetics of *amp^r* of the previously disclosed pUC19 plasmid (base number sequences from 2293 to 2312); in the present invention, Geno Tech Inc. (Taejon City, Republic of Korea) was asked to provide the synthesis. For other ODN, syntheses were conducted with agents producing conjugation of the dG run to the 3' terminus of p19 and ODN sequences for which activity had already been determined, and the syntheses were easily obtained.

The ODN produced so as to have phosphorothioate binding is protected from the attack of DNase existing within the cell, and conducts the role of extending the half life of the ODN in vivo. However, many problematic issues relative to safety arise with this method, due to the elicitation of nonspecific immunoreactions from the phosphorothioate binding itself. Actually, the inventors of the present invention treated ODN (50µg) which possessed phosphorothioate binding with aluminum hydroxide, and confirmed, as a result of injecting this together with gDE2t5µt derived from CHO, the appearance of granuloma in the region where the shots had been administered. On the other hand, while in vitro testing of CpG ODN possessing phosphodiester binding naturally produced no immunoreactions, injurious nonspecific

immunoreactions were also not observed with testing in vivo. This is believed to be due to action on the immune cell through nonspecific endocytosis, stemming from the possibility of DNase attack, along with the extremely low degree of efficacy. In order to solve the above-mentioned problems relative to safety with the phosphorothioate binding and low degree of immunogenicity with the disclosed phosphodiester binding, in the present invention, a dG run is conjugated to the 3' terminus of CpG ODN having phosphodiester binding, concurrently solving the problems relative to immunogenicity and safety.

In the present invention, a dG run is conjugated to the 3' terminus, and multiple CpG ODN, which are capable of increasing activity to induce immunoreactivity, are favorably p19 (SEQ ID NO: 2), M16 (SEQ ID NO: 9), M21 (SEQ ID NO: 14), and M22 (SEQ ID NO: 16). When a dG run is conjugated to the 5' terminus, interleukin-12 (below, IL-12) is secreted from the dendritic cell at a lower degree than when dG run is not conjugated; further, 5' dG run inhibits the secretion ability of IL12 for inducing immunoactivity, based on the CpG motif. Moreover, although the 5' run, as well as the 3' run, are both more efficacious relative to cell binding and cell internalization than are cases in which the run is lacking, the 3' terminus usage is more efficacious than cases in which the dG run is conjugated to the 5' terminus from the standpoint of cell binding and cell internalization. The efficaciousness of such cell binding and cell internalization was seen to disappear with the use of the dG run of other bases, such as, for example, when substituting with a dC run, and the specific efficacy of the dG run was apparent.

In particular, from the standpoint of production, the most favorable goal of the CpG ODN conjugated with the dG run of the present invention is achieved with the dendritic cell; this is because the IL-12 plays an important role in inducing immunoreactivity with Th-1, due to the core [importance] of the dendritic cell in inducing immunoreactivity in vivo. The ODN binding power of the dendritic cell is 4-fold that of the macrophage; however, the CpG ODN conjugated with the dG run of the present invention produces more than 50-fold as many IL-12 as the macrophage.

In embodied examples of the present invention, with CpG ODN resulting from in vitro testing which treated dendritic cells isolated from the spleens of mice, the dendritic cells were

stimulated so as to produce the secretion of tumor necrosis factor- α (herein, TNF- α) and IL-12. Moreover, macrophages or B cells from within the chest cavity were induced to produce IL-12 secretion. Accordingly, efficacy was only observed in the case of the dG run conjugated to the 3' terminus of CpG ODN, and was not observed in the case of conjugation to the 5' terminus.

On the other hand, conditions were examined relative to competitive binding, various ligands being utilized in order to test whether cell binding takes place with ODN conjugated with a dG run, based on certain receptors from among receptors existing on the surface of immune cells; as a result, the cell binding of ODN conjugated with the dG run of the present invention became inhibited only when based on specific ligands with SR-A; from this it was determined that the flow of ODN conjugated with the dG run into the cells occurred via receptors having SR-A ligand specificity.

The CpG ODN conjugated with the dG run provided based on the present invention is constructed with 4 strands in a 4-stranded helix tetraplex structure; consequently, binding to the SR of the antigen presenting cells takes place selectively, and, as a result, the CpG ODN concentration within the cells is calculated through the increase in production. Because the increased safety of this tetraplex structure, based on the G-quartet constructed based on the dG run, has been established, efficacy of the internalization provided through conjugation of the dG run-conjugated CpG ODN with the APCs is enhanced. The influence of the binding of receptor signals with SR on the production of cytokine has been established. For example, the facilitation of TNF- α genetic transcription from the macrophages of mice when binding maleyl-BSA (bovine serum albumin) to SR has been observed. However, the inhibition of IL-12 production when induced based on LPS from macrophages originating from bone marrow cells has also conversely been observed. On the other hand, it has been observed in the present invention that the level of cytokine production does not increase like that of TNF- α and IL-12 when only the G- homotetramer itself is simply conjugated with the SR. This is understood from the fact that cytokine production is not at all induced based on M1 or M16GC, in which the CpG motif does not exist, although they possess the dG₆ run. Consequently, in order to facilitate increased immunoactivity, it is of course important, with

the conjugation of the dG run to the 3' terminus of ODN, for the ODN itself to possess a CpG motif.

For the length of the dG run, in order to provide a minimized tetraplex construction, a dG run conjugated with a minimum of 4 continuous dG is necessary; IL-12 secretion is most effective with 6 conjugated dG. In the case that the length of the dG run continues to increase, there is no major difference in the level of secretion of IL-12, or, in the case of TNF- α , the maximum level of secretion is achieved with the binding of 15 dG. Consequently, because the overdose of TNF- α secretion in vivo can produce toxicity, it is favorable for the length of the dG run to fall between a minimum of 4 and a maximum of 15.

On the other hand, the CpG ODN conjugated with the dG run of the present invention is capable producing a greater level of secretion activity than is achieved through transformation via phosphorothioate conjugation of the bases of the 3' terminus or 5' terminus. The above-mentioned transformation via phosphorothioate binding favorably transforms 1~3 base bindings from either the 5' or 3' terminus.

More favorably, M21E (SEQ ID NO: 18) can be utilized to transform the 2 base bindings from the terminuses of both sides.

According to Experimental Example 8 of the present invention, in order to further increase the in vivo resistance against DNase of phosphodiester CpG ODN, with which a dG run had been introduced to the 3' terminus, two base bindings from both terminuses of CpG ODN conjugated with the dG run of the present invention were transformed through phosphorothioate binding, and the resultant effect on cytokine production within the dendritic cell was examined. Specifically, substitution was conducted of the two bases on each terminus of M21, which possesses the greatest level of ability for inducing IL-12 secretion from among dendritic cells, replacing each of them with phosphorothioate binding; subsequently, the cytokine secretion capabilities of 1826T and M21 were compared through in vivo experimentation. As a result of introducing phosphorothioate binding to the two bases of both terminuses with the CpG ODN, not only was the level of IL-12 secretion capability higher, as a matter of course, than that observed with the M21 constructed only

through phosphodiester binding, but it was confirmed that all bindings exhibited a higher standard of stimulatory activity of IL-12 secretion as compared to the 1826T constructed through phosphorothioate binding. This indicated the fact that the stimulatory activity of cytokine secretion is further increased, and resistance against DNase is further strengthened, through the introduction of phosphorothioate binding only to both terminuses.

The multiple CpG ODN provided according to the present invention may be usefully utilized as vaccine adjuvants and as immunotherapy agents; in particular, they may be used as immunotherapy agents in the treatment of allergies, asthma, autoimmune disease, etc., and as vaccine adjuvants in the prevention and treatment of such infectious diseases as AIDS, chronic hepatitis C, etc. At the present time, it is favorable for the above-mentioned multiple ODN, used together with antigens to induce immunoreactivity, to be administered 2~3 times over an interval of 2~4 weeks, at a volume of 0.1~2.5mg/kg. Moreover, the ratio of ODN relative to the antigens is favorably 0.2~10. Immunization of the antigens may be conducted together with the vaccine adjuvant aluminum hydroxide, usable *in vivo*, or they may be independently administered; either intramuscular or subcutaneous methods may be utilized for the administration. With ODN M16 and M21, the efficacy of which was strengthened based on the 3' conjugation of the dG run, the generation of Th-1 immunoreactant IgG2a, as well as a higher secretion ratio with interferon- γ /interleukin-4 (IFN- γ /IL-4) as compared with CD4-T helper cells, were respectively exhibited with the mice.

The present invention is explained below in detail through the use of working examples. However, the present invention is not limited to the working examples stated below.

<working example> Provision of CpG ODN with a dG run conjugated to the 3' terminus

In order to closely examine the efficacy of the dG run within CpG ODN having a phosphodiester backbone, examination was conducted of the base sequence putative dG run, GGGGCG, estimated through the run of deoxyriboguanosine, as well as the appropriate base sequence having the CpG motif AACGTT. As a result, sequences constructed of 20 bases of base sequence numbers 2293~2312 of ampicillin resistance genetic amp^r existing within

pUC19 were selected, and these were named as p19. Moreover, GenoTech Inc. was asked to produce as a control group syntheses of CpG ODN 1826, previously known to possess immunoactive capabilities (Jakob, T. et al., J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998), with respective phosphorothioate (below, 1826T) and phosphodiester (below, 1826D) backbones, and these were utilized. The above-mentioned multiple ODN were converted into a primary shape, and a portion of the bases were either substituted or provided as multiple ODN producing conjugation of the dG continuous sequence (dG run) to the 3' and 5' termini.

According to the same method as stated above, oligonucleotides which possessed sequences were synthesized, as shown in Table 1 below. The underlined portions in Table 1 below indicate the CpG motif portions existing within each ODN, the capital letters indicate phosphodiester binding, and the lower-case letters indicate phosphorothioate binding.

{Table 1}

Base Sequences of the Multiple CpG ODN Provided in the Present Invention

Name	SEQ ID NO	Base Sequence
1826T	1	5' tccatgacgttcctgacgtt3'
1826D		5' TCCATGACGTTCTTGACGTT3'
p19	2	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
p19d	3	5' GGAAAACGTTCTTC 3'
M1	4	5' GGAAAAGCTTCTTCGGGGCG 3'
M7	5	5' GGAAAACGTTCTTCGCCCCG 3'
M13	6	5' GGAAAACGTTCTTCGGGCCG 3'
M14	7	5' GGAAAACGTTCTTCGGCCCCG 3'
M15	8	5' GGAAAACGTTCTTCGGCGCG 3'
M16	9	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG 3'
M19	10	5' GGGGAAAACGTTCTTCGCCC 3'
M26	11	5' GGGGGGAAAACGTTCTTCGC 3'
M27	12	5' GGGGGGGGGAAAACGTTCTT 3'
M20	13	5' GGGGGGTCCATGACGTTCTTGACGTT3'

M21	14	5' TCCATGACGTTCTGACGTTGGGGGG 3'
M12	15	5' CTTAACGTTCT 3'
M22	16	5' CTTAACGTTCTGGGGGG 3'
M23	17	5' GGGGGGCTTAACGTTCT 3'

<Test Example 1> influence of the dG run on cytokine secretion from dendritic cells isolated from the spleens of mice

For the sake of comparative analysis of the degree of immunoactivity of the multiple CpG ODN provided in the above working example, dendritic cells were isolated from the spleens of C57BL/6 guinea pigs (from the Korean Experimental Animal Center) which were approximately 6~8 weeks old, and, following treatment of the CpG ODN, the degree of secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-12 (IL-12), were examined.

According to existing reports, the secretion of dendritic cells has been constructed through slight transformation (Singh, Net al., J. Immunol. 160, 4849-4880, 1998; Ridge, P.P. et al., Science 271, 1723-1726, 1996). Specifically, after inducing adhesion of the splenocytes of mice in a tissue culture plate for a 90 minute period, the non-adherent cells were removed, and the adherent cells were cultured for one day under the presence of 10 ng/ml of recombinant mouse GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor, R & D System). Following culturation, the non-adherent cells and adherent cells were then isolated by means of a percoll density gradient, and the low-density cell types with large quantities of dendritic cells from the interface were collected and utilized. 1×10^5 of dendritic cells were respectively treated with a 1.5 μ M density of CpG ODN; after 10 and 30 hours, the culture solutions were respectively collected, and the amounts of secreted TNF- α and IL-12 were measured, utilizing commercial ELISA kits (Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development System, TOTAL MOUSE IL-12 Duo Set ELISA Development System; Genzyme). These results are shown in Table 2.

Lipopolysaccharides (herein, LPS) were used with the positive control group; only the medium was utilized for the negative control group. The amounts of IL-12 and TNF- α were

assayed.

{Table 2}

Effects on the Cytokine (IL-12, TNF- α) Production of Dendritic Cells

Name	SEQ ID NO	IL-12 (ng/ml)	TNF- α
1826T	1	5.41 \pm 1.28	2768 \pm 628
1826D		0.37 \pm 0.07	134 \pm 58
p19	2	1.32 \pm 0.31	640 \pm 96
p19d	3	0.07 \pm 0.01	25 \pm 3
M1	4	0.05 \pm 0.01	27 \pm 3
M7	5	0.09 \pm 0.02	30 \pm 3
M13	6	0.07 \pm 0.01	20 \pm 1
M14	7	0.05 \pm 0.01	22 \pm 2
M15	8	0.08 \pm 0.02	36 \pm 5
M16	9	2.40 \pm 0.77	960 \pm 166
M19	10	0.13 \pm 0.05	39 \pm 6
M26	11	0.13 \pm 0.07	96 \pm 26
M27	12	0.07 \pm 0.03	64 \pm 19
M20	13	0.42 \pm 0.11	115 \pm 29
M21	14	3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176
M12	15	0.05 \pm 0.01	18 \pm 3
M22	16	0.88 \pm 0.17	408 \pm 55
M23	17	0.05 \pm 0.01	40 \pm 5
LPS		1.59 \pm 0.25	844 \pm 154
Medium		0.07 \pm 0.01	27 \pm 4

Table 2 above indicates significantly greater cytokine secretion with phosphorothioate transformation (1826T) than with phosphodiester (1826D). However, with p19, an approximately 4-fold greater degree of IL-12 secretion than 1826D was observed. Moreover, with such a high standard of cytokine secretion, with the GGGGCG run composed of dG, a portion of the dG was substituted with dC (M7, M13, M14, M15), or when it was

removed (p19d), a notable decrease was apparent. In addition, when the dC run composed of the dG of p19 was substituted with dG (M16), this activity was further strengthened. The same efficacy of this run composed of dG was also exhibited with other base sequences or lengths possessed by CpG ODN; in other words, M21 and M22 exhibited significantly high levels of TNF- α and IL-12 secretion as compared with 1826 and M12. In particular, the lack of efficacy in cytokine secretion exhibited in the case of conjugating a dG run to the 5' terminus (M19, M26, and M27) selectively showed that efficacy of the dG run was only exhibited when conjugated to the 3' terminus of CpG ODN.

<Test Example 2> Efficacy of the dG run with macrophages from the abdominal cavity, as well as with B cells

In order to investigate the promotion of cytokine secretion by dG ODN with macrophages and B cells in the same manner as with dendritic cells, testing was conducted of macrophages from the abdominal cavities of mice, as well as B cells obtained from the spleens of mice.

For the abdominal macrophages, the abdominal cavities of approximately 6~8 weeks old C57BL/6 guinea pigs (from the Korean Experimental Animal Center) were irrigated with a medium, and inoculated in a tissue culture plate. Following culturation for a 9 hour period, the cavities were irrigated 3 times with the medium, and the adherent cells were isolated and utilized. Moreover, for the B cells, following isolation of the non-adherent cells from the spleens of mice, microbeads (Miltenyl Biotech), which recognize specific cell surface marker CD19 (complement differentiation 19), were caused to bind to the B cells, and a (mini) MACS column (Miltenyl Biotech) was utilized to isolate these. A 1×10^5 quantity of macrophages and a 2×10^5 quantity of B cells were respectively treated with 3 μ M of CpG ODN; following a 30 hour period, the medium was obtained, and IL-12 ELISA was achieved.

As a result, when treating macrophages from the abdominal cavities of mice and B cells isolated from mice spleens with CpG ODN, the same as with dendritic cells, only ODN conjugated with the dG run to the 3' terminus exhibited high levels of IL-12 secretion. In particular, M16 and M21 exhibited significantly high levels of activity for inducing IL-12 secretion (refer to Figures 1a and 1b).

<Working Example 3> Changes in efficacy according to the length of the run composed of dG conjugated to the 3' terminus

P19d, with the (GGGGCG) run composed of dG of p19 removed, was used as the control group, and, following binding of various lengths of the dG run to the 3' terminus, the level of cytokine secretion with dendritic cells was measured. The concrete test process used for this is noted according to the method for Test Example 1 above. The results are shown in Figure 2.

From Figure 2 it can be determined that it is necessary for the dG run to be constructed with a minimum of 4 continuous dG, and that, in particular, when there are 6 deoxyriboguanosine—dG₆, the secretion of IL-12 is most effectively exhibited. In the case that the length of the dG run continues to increase, there is no major difference in the level of secretion of IL-12, or, in the case of TNF- α , the maximum level of secretion is achieved with a binding of 15 dG—dG₁₅; this exhibits an approximate 5-fold value as compared with ODN conjugated with dG₆.

<Working Example 4> Changes in ODN cell binding and the degree of secretion inducement within cells according to dG run conjugation

(4-1) Effects of the dG run on the cell binding of ODN

In order for the activity of the CpG ODN to be efficacious, it is necessary for there to be a high volume of ODN internalization into the cell. Accordingly, an examination was conducted relative to how the degree of binding to dendritic cells changes, as well as how the degree of internalization into the cells changes, based on the conjugation of the dG run..

For the sake of useful observation, multiple fODN, which produces a binding of fluorescein, composed of fluorescent material, were utilized on the 3' and 5' terminuses of CpG ODN. For observing the volume of fODN in cell binding, 1×10^5 of dendritic cells were treated with 5 μ M of fODN at 4° [symbol error in the original] C for one hour; subsequently, the cells

were irrigated twice with PBS (phosphate buffered saline), the non-binding fODN were removed, and a FACS (Becton Dickinson, USA) was utilized to measure the brightness of the fluorescence. For observing the volume of internalization of fODN into the cell, 1×10^5 of dendritic cells were treated with $1 \mu\text{M}$ of fODN at 4°C for 30 minutes, and after culturing these for respective 1.5 and 6 hour periods, the fODN adhered to the cell membrane were removed, and measurement was conducted. The degree to which the respective ODN conjugated to the dendritic cells, as well as the degree to which the respective ODN flowed into the cells, were measured by means of mean fluorescent intensity (herein, MFI); the degree of MFI existent when only the medium was present was set as the standard, and the degree of increase in MFI existing at the time of the presence of fM21 was used as the relative index, shown as the binding index, and the internalization index.

The results are as indicated in Figure 3. In other words, when the dG run was conjugated to the 3' or 5' terminus, ODN cell binding (Figure 3a) and cell internalization (Figure 3b) became significantly increased in comparison with cases in which ODN possessed no dG run. On the other hand, when the dG run was attached to the 3' terminus position, greater effectiveness was exhibited from the standpoint of cell binding and cell internalization as compared with cases in which the dG run was attached to the 5' terminus position. Moreover, such specific effectiveness of the dG run was evident when observing the disappearance which takes place when the dG run becomes changed to a dC run.

(4-2) Research on receptors conjugated with dG ODN.

In order to investigate the development of capabilities for conjugating to the cellular surface of ODN, including the dG run, based on certain receptors, a competitive binding assay was conducted, which treated previously existing known ligands conjugated to various receptors. In other words, dG₂₀, fucoidan (Sigma), and dextran sulfate (Sigma) were used as the SR-A ligands, LDL (low density lipoprotein, Sigma) was used as the SR-BI ligand, oleic acid (Sigma) was used as the CD36 ligand, and fibrogen (Sigma) and Anti-CD18 monoclonal antibodies (Pharmigen) were utilized as the Mac-1 (CD11b/CD18, $\alpha\text{M}\beta 2$) ligands. First, after culturing each 0.25 mg/ml ligand concentration with a $1 \mu\text{M}$ concentration of dG₂₀ and a $1 \mu\text{M}$ concentration of fM21, the MFI of the conjugated fM21 was measured, and the effects

of each ligand on the cell conjugation of ODN was investigated. As a result, only the specific ligands of SR-A were able to impede the dendritic cell conjugation of fM21 ODN conjugated to the 3' terminus of the dG run (refer to Table 3c). These results exhibit cell internalization via receptors having dG run SR-A ligand specificity.

<Working Example 5> Inhibition of cytokine secretion ability relative to the dG run conjugated to the 5' terminus

From the results of Test Example 1 it can be determined that the secretion of cytokine from dendritic cells fails to increase when the dG run is conjugated to the 5' terminus (Table 2; M19, M26, and M27). However, when the 5' dG run is also used in a tetraplex configured formation, the degree of dendritic cell conjugation is significantly high as compared with the case of ODN without the dG run (Test Example 4). These results indicate the transformability of the action of the dG run depending upon the position of the CpG ODN. In the present test example, in order to examine the variance in effects based upon the positioning of conjugation of the dG run with the CpG ODN, the dendritic cells were treated, together with the CpG ODN, with the cationic liposome LipogeneTM (Boditech Med Inc., Korea), and after identifying no correlation with the existence of the dG run, the volume of CpG ODN cell internalization was tested. Moreover, in order to investigate the effects based on differences in positioning of the dG run, a control group was formed of 1826D (SEQ ID NO: 2) having only two CpG motifs, and M12 (SEQ ID NO: 16) having only 1 CpG motif, and the effects of CpG ODN conjugated with a dG run to the 3' terminus (M21 and M22), as well as the effects of CpG ODN conjugated with a dG run to the 5' terminus (M20 and M23), were respectively investigated.

First, the dendritic cells were treated with a mixed liquor, with which 0.3 μ M of CpG ODN had been cultured together with 3 μ g of Lipogene for 30 minutes at room temperature; this was then cultured for a period of 4 hours. Subsequently, the Lipogene-ODN mixed liquor remaining in the medium was removed, and following an additional 24 period of culturation, the volume of IL-12 from the medium was measured. These results are shown in Table 3 below.

{Table 3}

Effects on Cytokine Secretion Depending on the Position of Conjugation of the dG Run

Name	dG Run Position	IL-12 (ng/ml) – Liposome	TNF- α (pg/ml)-Liposome	IL-12 (ng/ml) + Liposome
1826D		0.37 \pm 0.07	134 \pm 58	4.15 \pm 1.17
		3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176	8.11 \pm 2.19
		0.42 \pm 0.11	115 \pm 29	1.74 \pm 0.57
		0.05 \pm 0.01	18 \pm 3	1.68 \pm 0.33
		0.88 \pm 0.17	408 \pm 55	7.89 \pm 3.21
		0.05 \pm 0.01	40 \pm 5	0.86 \pm 0.25
*: No conjugation of the dG run				

As a result, it was discovered that, when treatment was conducted together with Liposome, high levels of IL-12 secretion from dendritic cells were also produced also in cases in which no dG run had been conjugated to the 3' terminus. However, in instances when the dG run existed on the 5' terminus, it was discovered, to the contrary, that a decreased level of IL-12 secretion was produced as compared with instances when the dG run was absent. From these results it was discovered that the 5' dG run contrarily inhibits the inducement of IL-12 secretion ability based on the CpG motif from dendritic cells.

<Test Example 6> Effects depending on the run base type conjugated to the 3' terminus

After conjugating a run structured by deoxyriboadenine (dA), deoxyribocytosine (dC), and deoxyribothymine (dT), instead of the dG run of M16, to the CpG ODN 3' terminus (M16-A, M16-C, and M16-T), when the CpG ODN were respectively transferred, either separately or together with Liposome, the effects on the secretion of IL-12 and TNF- α from dendritic cells were investigated. These results are indicated in Table 5 below.

{Table 5}

Effects Depending on the Base Category of the Run

Name	Sequence		TNF- α	IL-12 (ng/ml) +
------	----------	--	---------------	-----------------

			(pg/ml)-Liposome	Liposome
M16	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG3'	2.40±0.77	960±166	4.76±1.65
		0.05±0.01	25±2	5.56±1.10
		0.06±0.01	29±3	5.11±0.88
		0.06±0.01	45±8	4.35±0.52
		0.08±0.02	31±2	0.15±0.03

As a result, when the dendritic cells were treated independently without the Liposome, in the case of the dG run of M16 by itself, in which the dG run is conjugated to the 3' end, while it also has the CpG motif, significantly higher levels of cytokine secretion stimulatory activity were exhibited as compared to cases when CpG ODN was conjugated with dA, dC, and dT (M16-A, M16-C, and M16-T). On the other hand, when administered together with 3 μ M of Liposome, the tendency for similar IL-12 secretion was observed, or else, in this instance also, the existence of the CpG motif was exhibited as being essential to the increase in immunoactivity. These results indicated that the dG run conjugated to the 3' terminus is only involved with cell inflow, and does not play a large part in signal transmission related to cytokine secretion within the cell.

<Test Example 7> Changes in CpG ODN immunoactivity based on dG run in vivo

(7-1) Efficacy in eliciting the immunoreactions of CpG ODN conjugated to dG run (antigen: HIV)

In order to examine whether the capabilities of CpG ODN for immunoactivity based on dG run are also applicable in vivo, the immunoactivity elicited based on phosphodiester CpG ODN conjugated to dG run in mice was examined. When only CpG ODN having a general phosphorothioate backbone was injected together with the antigen, it became apparent that immunoreactivity was primarily induced in the direction of Th-1 immunoreactivity. Therefore, in order to examine whether CpG ODN with a phosphodiester backbone that conjugates dG run to the 3' terminus is capable of immunomodulation that is analogous to this, dG run efficacy in vivo was examined in the present test.

6-8 week old Balb/c guinea pigs (from the Korean Experimental Animal Center) were administered subcutaneous injections of a mixture of 5 µg/mouse of human immunodeficiency virus (HIV) particle, which had previously been treated with aluminum hydroxide (Sigma), as well as 50 µg/mouse of M16 CpG ODN. Four weeks after all of the mice had received their first inoculation, boosting was conducted, and two weeks thereafter the humoral immune immunoreactions were examined through ELISA analysis. In the ELISA analysis, HIV particles were utilized as antigens to specifically observe anti-HIV IgG reactions, and anti-mouse IgG, IgG1, and IgG2a (Southern Biotechnology, USA), conjugated with horseradish peroxidase (HRP), were utilized as second antibodies. For color reactions, tetramethyl-benzidine (TMB) solution was used as the substrate, and the test was conducted.

The results are illustrated in Figure 4a. When treatment with M16 conjugated with dG run to the 3' terminus was conducted together with HIV particles, it was discovered that the immunoglobulin G (IgG) and representative Th-1 immunoreactive IgG2a reactions all randomly increased to a meaningful degree overall. However, when the dG run was present on the 3' terminus or when administered together with ODN (M16C and M16GC) containing GpC instead of CpG, this efficacy became negligible (refer to Figure 4a). These results indicate that M16 ODN increases Th-1 immunoreactivity, and suggest that this efficacy is dependent on the CpG motif of M16 and the dG run of the 3' terminus.

(7-2) Efficacy in eliciting the humoral immunoreactions of CpG ODN conjugated to dG run (antigen: gDE2t)

When only CpG ODN having a general phosphorothioate backbone was injected together with the antigen, it became apparent that immunoreactivity was primarily induced in the direction of Th-1 immunoreactivity. Therefore, in order to more closely examine the efficacy of immunomodulation based on dG run conjugation, the 1826T ODN of the phosphorothioate backbone, already well known for its efficacy, was used as the control group, and the efficacy of M21's conjugation of the dG run to the 3' terminus of 1826D and 1826D [sic—1826T] was comparatively analyzed. As the antigen, the herpes simplex virus (HSV) glycoprotein gD was combined with the glycoprotein E2 protein of the hepatitis C virus (HCV) to form gDE2t, which was utilized. Moreover, in order to more precisely observe the efficacy of

ODN immunomodulation, a comparatively small amount (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of CpG ODN was administered instead of aluminum hydroxide (alum). For the method of administration, 5 μg of gDE2t protein isolated from the ovarian cells of Chinese hamsters (CHO) was intramuscularly administered together with 2 μg of ODN (1826D, 1826T, M21) to Balb/c mice; four weeks later, boosting was conducted, and two weeks thereafter the humoral immunoreactions were examined. In the ELISA analysis, the Hgh-E2t protein derived from CHO was utilized as an antigen to specifically observe anti-E2tIgG2a reactions, and anti-mouse IgG2a conjugated with HRP was utilized as a second antibody. These results are also shown in Figure 4b.

When the immunoreactive IgG2a titer of representative Th-1 was examined, the 1826D ODN of the phosphodiester backbone showed an extremely low IgG2a titer relative to E2. However, 1826T, transformed through the phosphorothioate backbone, exhibited the same high IgG2a titer as described in existing reports. In cases in which M21 conjugated the dG run to the 3' terminus of 1826D, an approximate 50-fold higher level of IgG2a reactions were observed as compared to 1826D. These results can be considered identical to the above-mentioned results (7-1). In other words, the capabilities for inducing the Th-1 immunoactivity of CpG ODN of the phosphodiester backbone based on dG run conjugation have increased.

(7-3) Efficacy in eliciting the cellular immunoreactions of CpG ODN conjugated to dG run (antigen: gDE2t)

For the sake of more precise examination, $\text{CD4}^+\text{T}$ cells were isolated from the spleens of immunized mice, and the cytokine isolated during activation were examined. 2×10^5 of $\text{CD4}^+\text{T}$ cells were treated with E2t antigen isolated from the ovaries of Chinese hamsters (CHO) in respective densities of 1 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and the cells were cultured for 5 days at 37°C . For the sake of comparing the degree of secretion of the representative cytokine IL-4 of the Th-2 immunoreactions with the representative cytokine IFN- γ of the Th-2 immunoreactions from the medium, the type of immunoreactions was determined. As can be seen in Figure 4c, the observation of a high IFN- γ / IL-4 ratio became apparent in the case of inoculation with M21, as compared with 1826D. Moreover, these results were also

observed in the inoculation of 1826T. In other words, due to dG run conjugation, it was observed that the immunoregulatory capabilities of the CpG ODN of the phosphodiester backbone induced immunoreactions in the Th-1 direction through methods similar to the transformation of the phosphrothioate backbone.

<Test Example 8> Improvements to cytokine secretion capabilities based on the introduction of phosphrothioate transformation to both termini of ODN

In order to further increase the resistance against DNase of phosphodiester CpG ODN in vivo, with which the dG run has been introduced to the 3' terminus, in the present invention, the base conjugations to the two termini on both ends of the CpG ODN were transformed from phosphodiester conjugations to phosphrothioate conjugations. Following the respective substitution of the two bases at the ends of both sides of M21, which causes the highest degree of secretion of IL-12 within dendritic cells, with phosphrothioate conjugations, the secretion capabilities of IL-12 were analyzed in comparison with 1826T and M21, through in vitro testing. These results are shown in Table 6 below. In the table below, the lower case letters indicate phosphrothioate binding, and the capital letters indicate phosphodiester binding.

{ Table 6 }

Effects on Cytokine Secretion when Both Termini are Substituted with Phosphrothioate Binding

Name	SEQ NO	ID	Sequence	IL-12 (ng/ml)
1826T	1		5' tccatgacgttcctgacgtt3'	5.41±1.28
M21	14		5' TCCATGACGTTTCCTGACGTTGGGGGG 3'	3.04±0.57
M21E	18		5' tcCATGACGTTTCCTGACGTTGGGCgg 3'	6.03±2.19

As a result, M21E, with which the phosphrothioate binding was conjugated to the two bases at both termini of M21, exhibited a two-fold higher level of activity relative to the stimulation of IL-12 secretion as compared to M21, and also observed higher standards of such activity as compared to 1826T, which had before shown the highest capability for IL-12 secretion

with dendritic cells. These results demonstrate that, through introducing phosphorothioate transformation solely to both end portions, the stimulatory activity of cytokine secretion is further increased, and DNase resistance is further strengthened.

Effects of the Invention

As observed above, the transformed phosphodiester CpG ODN with the dG run conjugated to the 3' terminus of the present invention exhibits high levels of activity for inducing th-1 immunoreactivity, and, differently from previously disclosed CpG ODN transformed through the phosphorothioate backbone, due to its avoidance of inducing toxicity and increase of safety in vivo, may be utilized as an effective vaccine adjuvant and immunotherapy agent.

(57) Scope of the Claim

Claim No. 1

With a phosphodiester oligodeoxynucleotide (ODN) having immunoactivity, dG-modified oligodeoxynucleotide which is characterized by being conjugated with deoxyriboguanosine (dG) run.

Claim No. 2

ODN of Claim 1, in which the dG-modified oligodeoxynucleotide is characterized by having a CpG motif.

Claim No. 3

dG run of Claim 1, in which the dG-modified oligodeoxynucleotide is characterized by conjugation to the 3' terminus of ODN.

Claim No. 4

dG run of Claim 1, in which the dG-modified oligodeoxynucleotide is characterized by having a nucleotide length which is minimally 4 and no greater than 15, and by the presence of a minimum of 4 dG runs.

Claim No. 5

dG-modified oligodeoxynucleotide of Claim 1, characterized by the substitution of 1~3 phosphodiester nucleotide conjugations of the 3' and 5' termini through phosphorothioate conjugation.

Claim No. 6

ODN of Claim 1, in which the dG-modified oligodeoxynucleotide is characterized by specific binding to immune cells having SR (scavenger receptors).

Claim No. 7

dG-modified oligodeoxynucleotide of Claim 1, characterized by specific action on antigen

presenting cells including dendritic cells, macrophages, and B cells.

Claim No. 8

dG-modified oligodeoxynucleotide of Claim 1, characterized by the promotion of IL-12 and TNF- α secretion from dendritic cells.

Claim No. 9

dG-modified oligodeoxynucleotide of Claims 1 and 5, characterized by having the Base Number Sequences 2, 9, 14, 16, and 18.

Claim No. 10

Claim in which the dG-modified oligodeoxynucleotide of Claim 1 may be utilized as an effective ingredient in a vaccine adjuvant and immunotherapy agent.

Claim No. 11

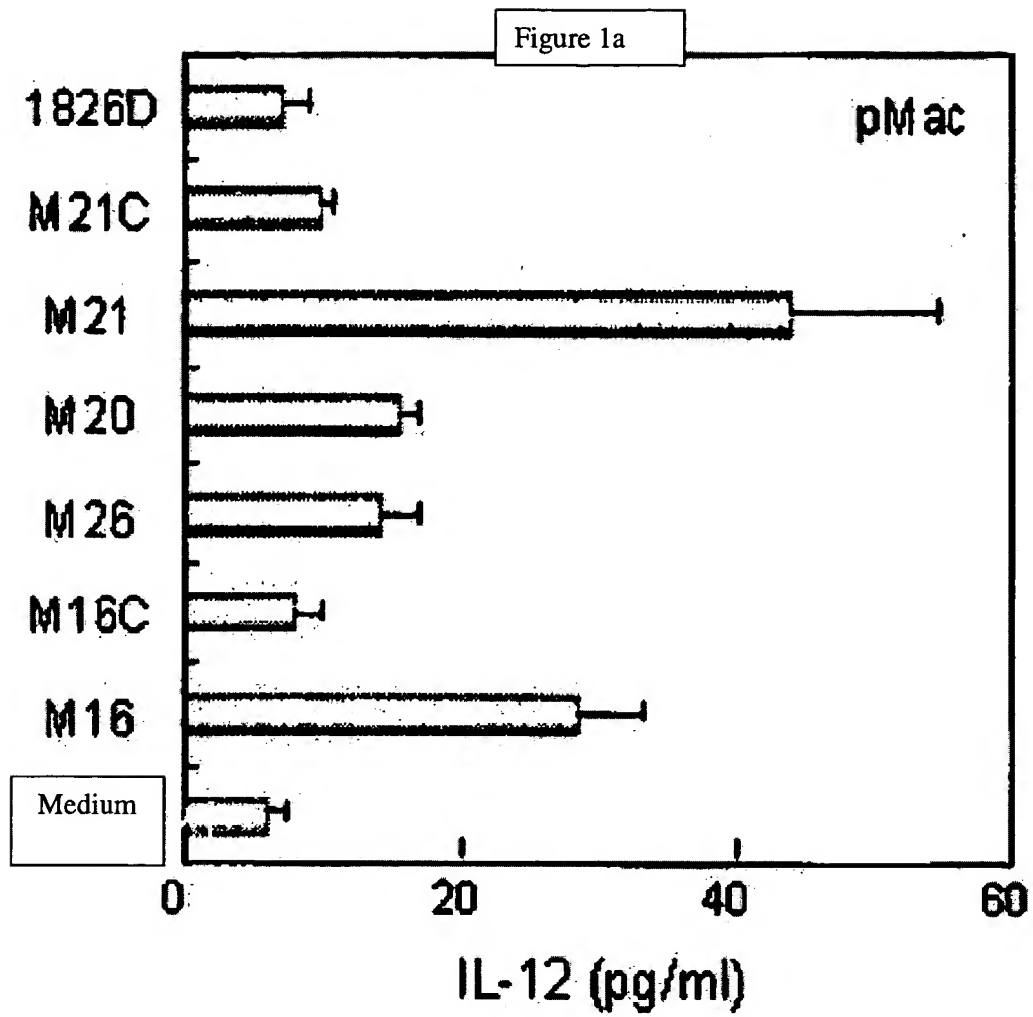
Vaccine adjuvant and immunotherapy agent of Claim 10, characterized by being additionally utilizable with different antigens.

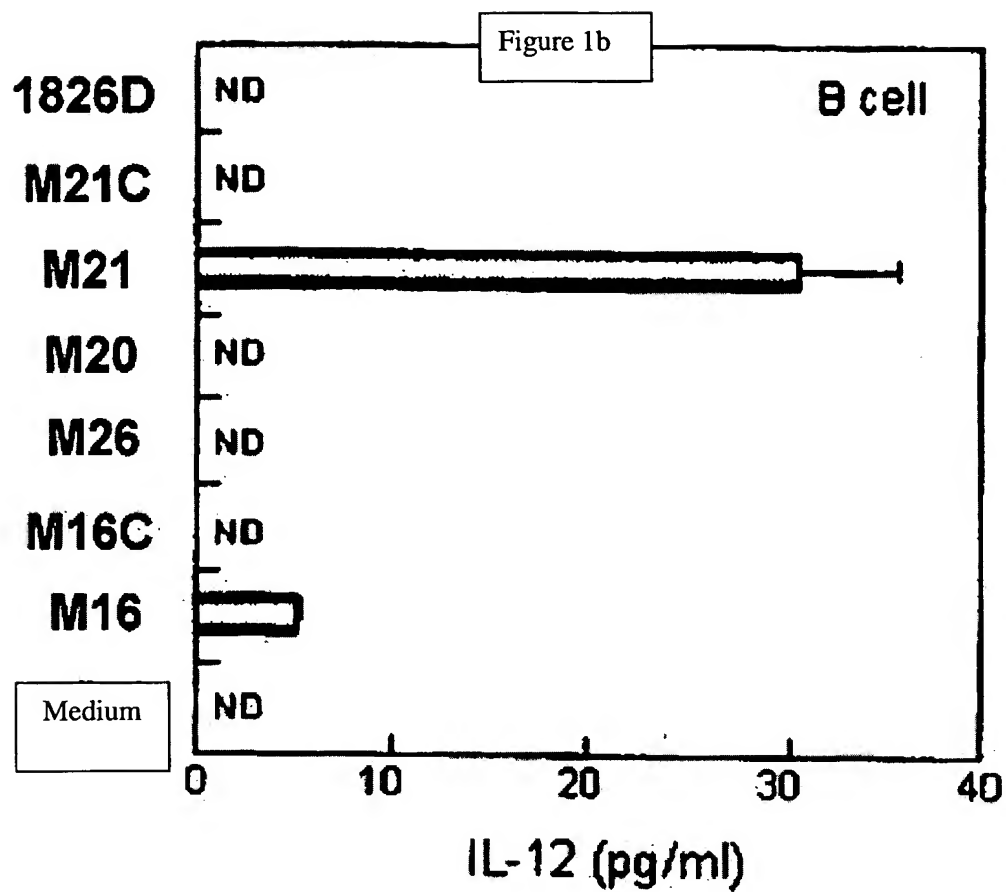
Claim 12

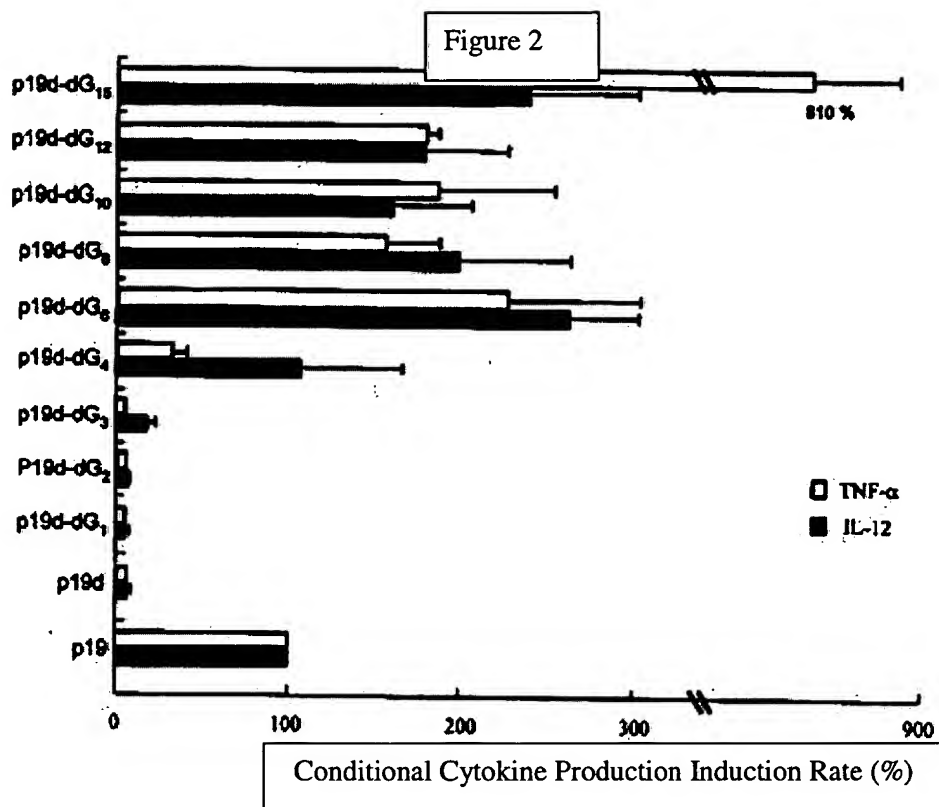
Above vaccine of Claims 10 and 11, in which the vaccine adjuvant is characterized by the prevention and treatment of infectious diseases such as AIDS and chronic hepatitis C.

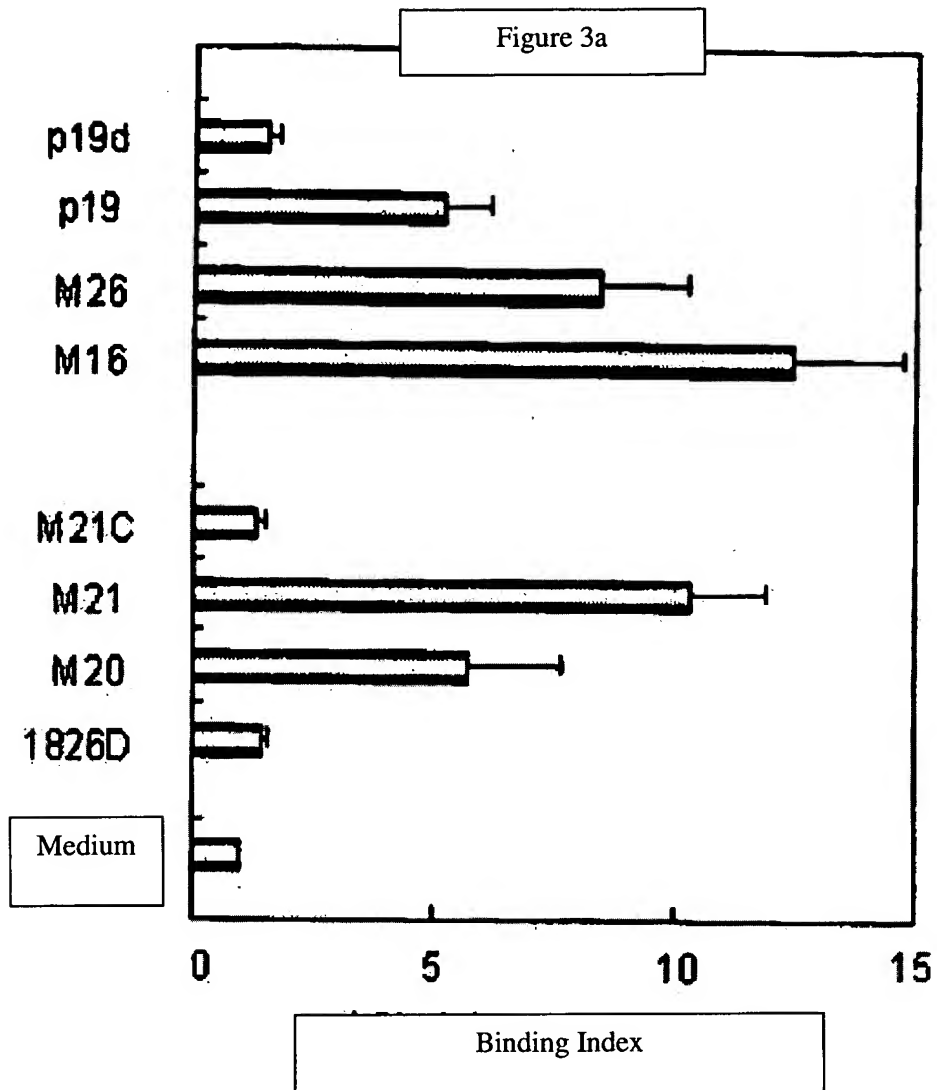
Claim 13

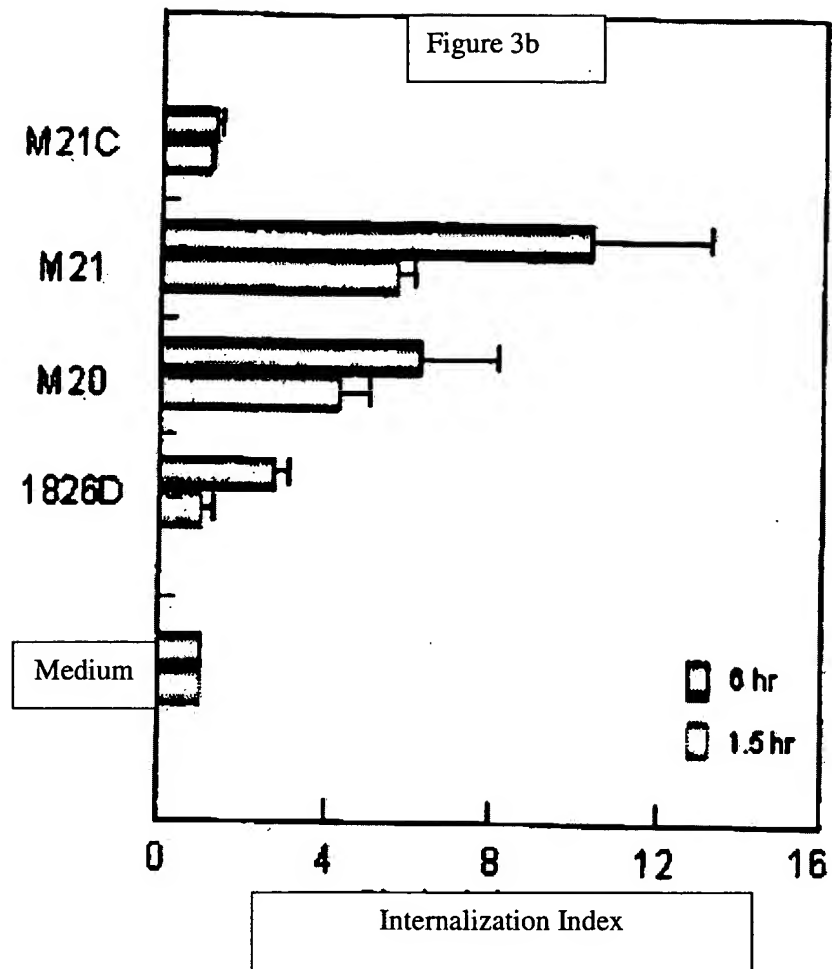
Above therapy agent of Claims 10 and 11, in which the immunotherapy agent is characterized by being utilized in the treatment of allergies, asthma, and autoimmune disease.

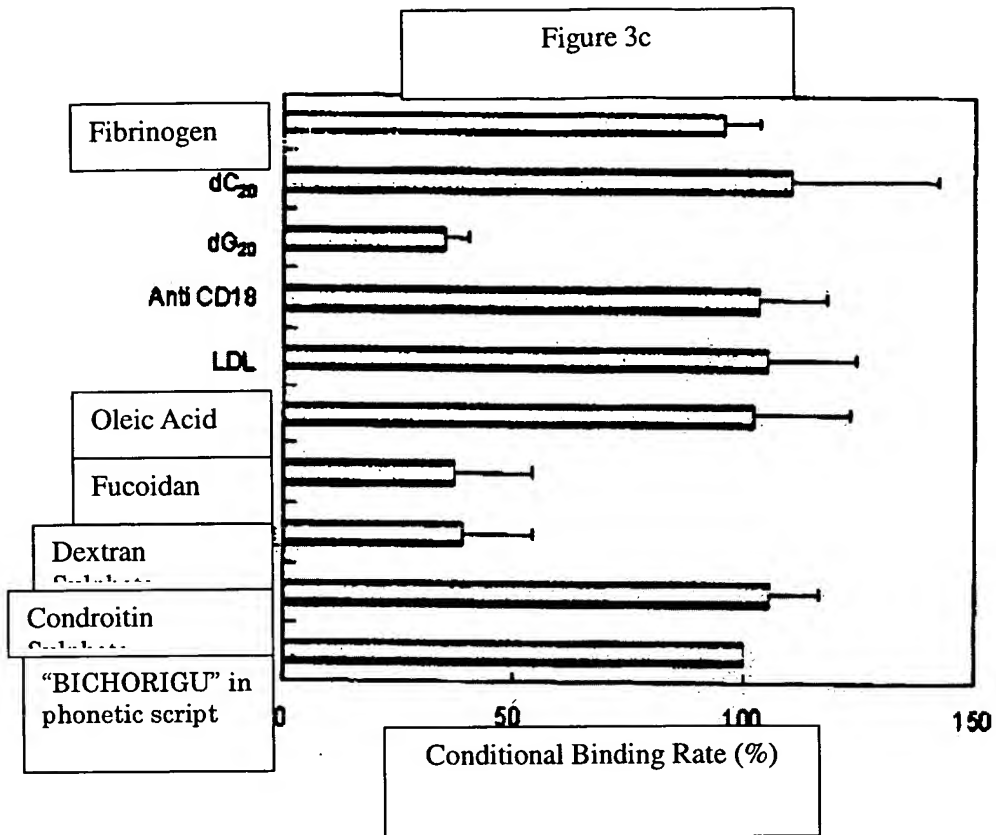


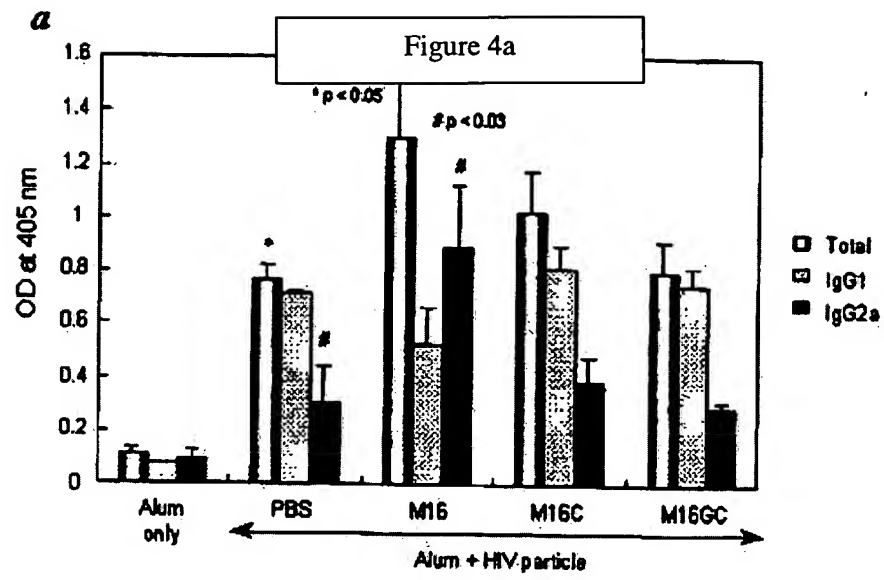












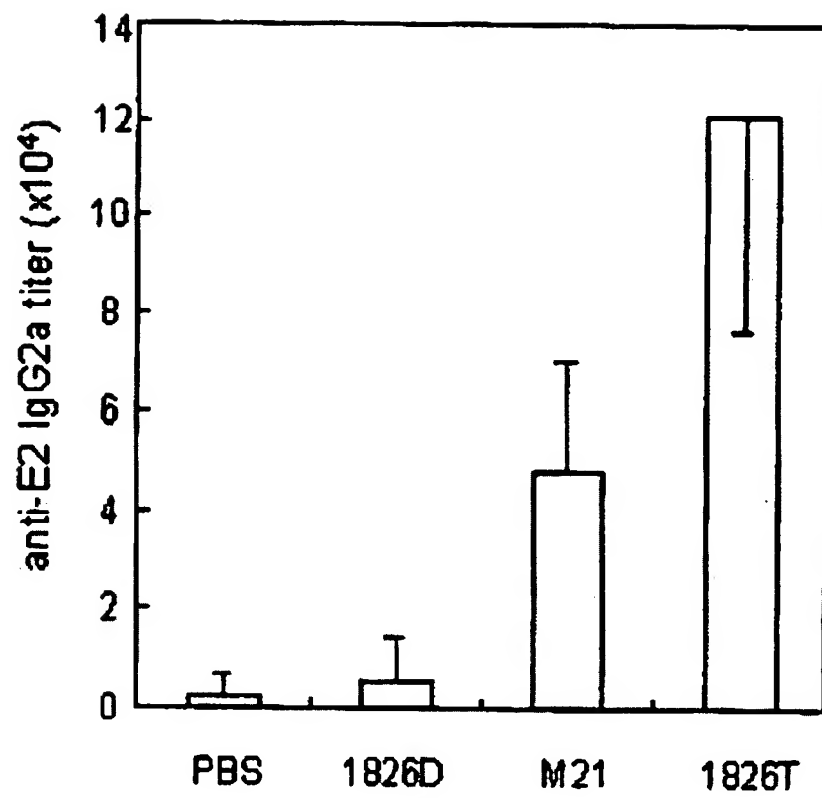
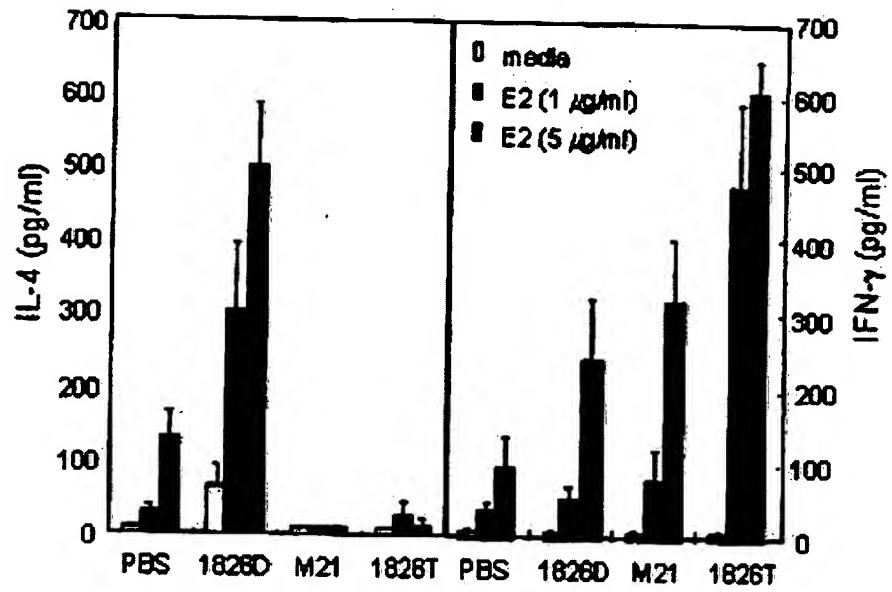


Figure 4b

Figure 4c



< 223 synthetic CpG oligonucleotide with a phosphorothioate backbone
 >
 < 400 1
 >
 tccatgacgt tctgacgtt
 < 210 2 20
 >
 < 211 20
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence
 >
 < 220
 >
 < 223 p19
 >
 which is a phosph oligon havin a CpG motif and a 3
 hodie ucleo g
 ster tide
 putative dG run (GGGGCG correspondin to 2293
), g 2312
 of a mpicillin resistant gene derived from pUC 19
 < 400 2
 >
 ggaaaacgtt ctctggggcg
 < 210 3 20
 >
 < 211 14
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence
 >
 < 220
 >
 < 223 p19d which is a phosphodiester oligonucleotide having a CpG motif
 >
 < 400 3
 >
 ggaaaacgtt ctct
 < 210 4 14
 >
 < 211 20
 >
 < 212 DNA
 >
 < 213 Artificial Sequence

```

< 220
>
< 223 M1 which is a phosphodiester oligonucleotide having GpC sequence instead of CpG within the CpG
> motif of p19
< 400 4
>
ggaaaagctt cttcggggcg
< 210 5
>
< 211 20

< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 M7 wherein GCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d
>
< 400 5
>
ggaaaacgtt cttcgccccg
< 210 6
>
< 211 20
>
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 M13 wherein GGGCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d >
< 400 6
>
ggaaaacgtt cttcgggccg
< 210 7
>
< 211 20
>
< 212 DNA
< 213 Artificial Sequence >
< 220

< 223 M14 wherein GGCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d
>
< 400 7
>

```

ggaaaacgtt cttcggcccg

< 210 8

>

20

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M15 wherein GCGCG is conjugated to 3' terminus of p19d >

< 400 8

>

ggaaaacgtt cttcggcgcg

< 210 9

>

< 211 20

20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M16 wherein GGGGGG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 9

>

ggaaaacgtt cttcgggggg

20

< 210 10

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

< 223 M19 wherein GG is conjugated to the 5' terminus and GCCC is conjugated to the 3' terminus of p

> 19d

< 400 10 >

ggggaaaacg ttctcgccc

20

< 210 11 >

< 211 20 >

```

< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence >
< 220
>
< 223 M26 wherein GG is conjugated to the 5' terminus of 3'CC -deleted M 19
>
< 400 11
>
ggggggaaaa cgttcttcgc
< 210 12
>
< 211 20
>
20
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 M27 wherein GGGGG is conjugated to the 5' terminus of 3'CGCCC -deleted M19 >
< 400 12
>
ggggggggga aaacgttctt
< 210 13
>
< 211 26
>
20
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 M20 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of 1826D
>
< 400 13
>
ggggggtcca tgacgttctt gacgtt
< 210 14
>
< 211 26
>
26
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence >
< 220
>

```

< 223 M21 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of 1826D

>

< 400 14

>

tccatgacgt tcctgacgtt gggggg

< 210 15

>

< 211 11

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M12 which is a phosphodiester oligonucleotide having a single CpG motif >

< 400 15

>

cttaacgttc t

< 210 16

>

< 211 17

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M22 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of M12

>

< 400 16

cttaacgttc tggggg

< 210 17

26

17

>
< 211 17
>
< 212 DNA
>
< 213 Artificial Sequence
>
< 220
>
< 223 M23 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of M12
>
< 400 17
>
ggggggccta acgttct

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C07H 21/00

(11) 공개번호 특2001 -0063153
(43) 공개일자 2001년07월09일

(21) 출원번호 10 -1999 -0060032
(22) 출원일자 1999년12월21일

(71) 출원인 주식회사 제넥신
서유석
경북 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교 생명과학동

(72) 발명자 성영철
경상북도포항시남구지곡동교수아파트6동902호
이승우
경상북도포항시남구지곡동756남자기숙사11동110호
송만기
경상북도포항시남구지곡동대학원아파트4동1103호
백관혁
인천광역시남구학익동48 -1

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 면역조절능력 및 안전성이 증가되고 d G 연속서열이결합된 포스포다이에스터 C p G 올리고데옥시뉴클레오티드 변형체

요약

본 발명은 면역조절능력이 증가된 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 변형체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 면역조절능력을 갖는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드의 3' 말단에 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열을 결합시킴으로써 SR(scaenger receptor)을 갖는 면역세포에 특이적인 결합능을 향상시켜 Th -1 면역활성을 최대화하면서 인체에 대한 독성을 유발하지 않는 CpG ODN을 제공하며, 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 알레르기, 천식, 자가면역질환등의 면역치료제로 사용될 수 있을 뿐 아니라 후천성 면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrom, AIDS) 및 C형 만성간염 등의 감염성 질병들에 대한 예방 및 치료 백신의 보조제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도
도 4a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN이 대식세포(도 1a)와 B 세포(도 1b)에서 IL -12의 분비에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고,

도 2는 3' 말단에 결합된 dG 연속서열의 길이에 따른 사이토카인 분비 효능성을 나타낸 그래프이고,

도 3a는 dG 연속서열이 결합된 ODN이 수상돌기세포의 표면에 결합하는 정도를 나타낸 그래프이고,

도 3b는 dG 연속서열이 결합된 ODN이 수상돌기세포의 내부로 유입되는 정도는 나타낸 그래프이고,

도 3c는 SR -A 리간드인 dG₂₀, 푸코이단, 텍스트란 설페이트와, SR -BI 리간드인 I.DL, CD36의 리간드인 올레산, Mac -1 리간드인 피브리노겐과 항 CD18 단일클론항체를 사용한 경쟁적 결합 분석을 통해 dG 연속서열이 결합된 ODN이 어떠한 세포 표면 수용체를 통해 세포 내로 유입되는지는 조사한 결과이고,

도 4a는 HIV 입자(particle)와 함께 dG 연속서열이 결합된 ODN을 포함하거나 포함하지 않은 상태로 면역반응을 유도하여 생체 내에서 dG 연속서열이 Th -1 면역반응을 유도하는지 여부를 면역글로불린의 양을 측정하여 조사한 결과이고,

도 4b는 마우스에 1826D, 1826T 및 M21과 gDE2t 단백질을 근육주사한 후 항 E2 IgG2a 역가를 측정한 ELISA 결과를 나타낸 것이고,

도 4c는 ODN들과 gDE2t 단백질이 함께 면역된 생쥐의 CD4⁺ T세포로부터 사이토카인(IL -4 및 IFN - γ)의 분비에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 면역조절능력이 증가된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 변형체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 면역조절능력을 갖는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드의 3' 말단에 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열을 결합시킴으로써 제거세포 수용체(scavenger receptor, 이하 SR이라 함)를 갖는 면역세포에 대한 특이적인 결합능을 향상시켜 보조 T 세포타입 -1(Th -1) 면역활성을 최대화하면서 인체에 대한 독성은 유발하지 않는, 백신 보조제 및 면역치료제로 유용한 CpG ODN 변형체에 관한 것이다.

CpG 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide, 이하 'CpG ODN'이라 한다.)는 선천성 및 후천성 면역반응을 모두 활성화시킬 수 있는 유용한 면역 조절제로 알려져 있다. 구체적으로 CpG ODN은 주로 항원 제시 세포들(antigen presenting cells, 이하 APCs라 함), 예를 들어 B 세포, 대식세포(macrophage) 및 수상돌기세포(dendritic cell)를 활성화시켜 생체내 면역증강에 중요한 사이토카인(cytokine)의 분비나 동시 -자극분자(co -stimulatory molecule)의 발현을 촉진한다는 사실이 생체의 실험을 통해 밝혀져 있다(Klinman, D.M.et al.,PNAS USA93, 2879 -2883, 1996; Krieg, A.M.et al.,Nature374, 546 -549, 1995; Jakob, T.et al.,J. Immunol.161, 3042 -3049, 1998; Sparwasser, T.et al.,Eur. J. Immunol.28, 2045 -2054, 1998). CpG ODN은 APC의 엔도솜(endosome)으로 유입되고 그 활성화에는 엔도솜의 성숙이 필수적으로 요구된다. 그러나 상기 CpG ODN이 면역증강 효과를 유도하는데 어떠한 생체내 신호전달 과정을 거치는지 또는 ODN의 CpG 서열을 인식하는 생체내 분자가 무엇인지 등 자세한 기전은 아직 알려져 있지 않다.

한편 CpG ODN은 짧은 길이의 올리고뉴클레오타이드로서 생체 내에 풍부하게 존재하는 핵산 분해효소(nuclease)에 의해 쉽게 분해되어 그 활성을 잃는다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 CpG ODN의 골격을 포스포로티오에이트 결합(phosphorothioate backbone)으로 변형하는 방법이 사용되어 왔다(Stein, C.A. & Cheng, Y.C.Science261, 1004 -1012, 1993). 이는 포스포로티오에이트 결합이 기존의 포스포다이에스터 결합(phosphodiester backbone)에 비해 핵산 분해효소에 대한 저항성이 높아 CpG ODN의 생체내 반감기를 증가시킬 수 있는 성질을 이용한 것이다. 그러나 최근 들어 포스포로티오에이트 골격 자체가 생체내에서 비특이적 면역활성을 강하게 유도하고, 그로 인해 생체에 독성을 유발한다는 사실이 보고됨(Monteith, D.K.et al.,Toxicol. Pathol.27, 307 -317, 1999; Wagner, H.Adv. Immunol.73, 329 -368, 1999)에 따라 CpG ODN의 골격을 포스포로티오에이트 결합으로 변형시키는 방법은 안전성에 있어 문제점을 드러내고 있다.

이에 따라 본 발명자들은 CpG ODN의 면역활성은 극대화하면서 인체에 해로운 비특이적 면역반응을 최소화할 수 있는 새로운 CpG ODN 변형체를 찾기 위해 연구한 결과, 포스포다이에스터 CpG ODN의 3' 말단에 일정한 길이의 데옥시리보구아노신 연속서열(dG run)을 결합시키면 B 세포, 대식세포 및 수상돌기세포와 같이 제거세포 수용체(scavenger receptor, 이하 SR이라 함)를 발현하는 면역세포로의 특이적인 전달을 가능하게 할 뿐 아니라, 생체내에서 보조 T 세포 -1(Th -1) 면역반응을 극대화하고, 핵산 분해효소에 의한 CpG ODN의 분해를 억제하며 포스포로티오에이트 골격과는 달리 인체 내에서 독성을 나타내는 비특이적 면역반응을 최소화할 수 있음을 알아냄으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 Th -1 면역활성을 극대화하면서, 인체에 독성을 나타내는 비특이적 면역반응을 최소화한 포스포다이에스터 CpG ODN 변형체를 제공하는 것이다.

또한 본 발명의 목적은 SR을 갖는 면역세포에 특이적인 결합능이 증가된 CpG ODN 변형체를 제공하는 것이다.

나아가 본 발명의 목적은 상기 CpG ODN 변형체를 백신 보조제 및 면역치료제로 사용하는 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 3' 말단에 데옥시리보구아노신 연속서열(dG run)이 결합된 것을 특징으로 하며 CpG 모티프를 갖는 포스포다이에스터 올리고데옥시뉴클레오타이드(oligodeoxynucleotide, 이하 'ODN'이라 함) 변형체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN 중 Th -1 면역활성을 특이적으로 유도하는 서열번호 2, 9, 14, 16 또는 18로 기재되는 염기서열을 갖는 CpG ODN 변형체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN을 백신보조제 및 면역치료제로 사용하는 용도를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 명세서에서 'ODN'이라 함은 면역반응을 활성화할 수 있는 11~26 nt 길이의 올리고데옥시뉴클레오타이드를 의미하며, 특히 'CpG ODN'은 면역조절능력을 나타내는 CpG 모티프(5' Purine Purine CpG Pyrimidine Pyrimidine 3')를 갖는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 말한다.

'dG 연속서열'이란 데옥시리보구아노신이 최소한 4개 이상 연속적으로 포스포다이에스터 결합으로 CpG ODN에 연결된 형태를 지칭한다.

본 발명에서 p19 ODN 서열은 이미 공지된 pUC19 플라스미드의 amp^r 유전자에서 유래된 것으로 (염기순서 2293에서 2312), 본 발명의 실시예에서는 GenoTech(대전시, 대한민국)사에 합성을 의뢰하여 제조하였다. 다른 ODN들은 p19 및 이미 활성이 알려진 ODN 서열에 dG 연속서열을 3' 말단에 결합시킨 채로 합성해서 쉽게 얻을 수 있다.

포스포로티오에이트 결합을 갖도록 제조된 ODN은 세포내에 존재하는 핵산분해효소의 공격으로부터 보호되어 생체내에서 ODN의 반감기를 연장시키는 역할을 한다. 그러나 포스포로티오에이트 결합 자체에 의한 비특이적 면역반응의 유발로 인해 안전성에 많은 문제점을 갖고 있다. 실제로 본 발명자들이 포스포로티오에이트 결합을 갖는 ODN(50 μ g)을 알루미늄 하이드록사이드로 처리하여 CHO에서 유래한 gDE2t 5 μ g와 함께 쥐에 주사해본 결과, 주사부위에서 육종(granuloma)이 발생하는 것을 확인하였다. 반면, 포스포다이에스터 결합을 갖는 CpG ODN들은 시험관 내(in vitro) 실험은 물론 생체내(in vivo) 실험에서도 인체에 해로운 비특이적 면역반응은 나타내지 않았다. 이는 핵산분해효소에 대한 공격가능성 및 효율 면에서 상당히 낮은 정도로 비특이적 엔도사이토시스(endocytosis)를 통해 면역세포에 작용하기 때문인 것으로 여겨진다. 이와 같이 포스포로티오에이트 결합이 갖는 안전성의 문제와 공지의 포스포다이에스터 결합이 갖는 낮은 면역원성의 문제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 dG 연속서열을 포스포다이에스터 결합을 갖는 CpG ODN의 3' 말단에 결합하여 면역원성과 안전성의 문제를 동시에 해결하였다.

본 발명에서 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시켜 그 면역반응 유도활성을 증가시킬 수 있는 CpG ODN들은 서열번호 2의 p19, 서열번호 9의 M16, 서열번호 14의 M21 및 서열번호 16의 M22인 것이 바람직하다. 5' 말단에 dG 연속서열이 결합된 경우에는 dG 연속서열이 결합되지 않은 경우보다 더 낮은 정도로 수상돌기세포에서 인터루킨 -12(interleukin -12, 이하 IL -12라 함)가 분비되어, 오히려 5' dG 연속서열은 CpG 모티프에 의해 유도되는 IL -12의 분비능력을 억제한다. 또한 5' dG 연속서열은 3' dG 연속서열과 마찬가지로 연속서열이 없는 경우에 비해서는 세포 결합 및 세포 내로의 유입 면에서 더욱 효과적이지만, 3' 말단의 경우가 5' 말단에 dG 연속서열이 결합한 경우보다 세포 결합 및 세포 내 유입면에서 더욱 효과적이다. 이러한 세포 결합 및 세포내 유입효과는 dG 연속서열을 다른 염기, 예를 들어 dC 연속서열로 치환한 경우에는 사라지는 것으로 보아 dG 연속서열의 특이적인 효과임을 알 수 있다.

특히 IL -12의 생산면에서 수상돌기세포는 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 가장 바람직한 목표가 되는데, 이는 수상돌기세포가 생체내에서 면역반응 유도에 핵심적이며 IL -12는 Th -1 면역반응의 유도에 중요한 역할을 하기 때문이다. 수상돌기세포는 대식세포에 비해 ODN에 대한 결합력이 4배 이상 낮지만, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 대식세포보다 약 50배 이상 IL -12를 많이 생산한다.

본 발명의 실시예에서 생쥐의 지라로부터 분리한 수상돌기세포에 처리한 생체의 실험(in vitro) 결과 CpG ODN들은 수상돌기세포를 자극하여 종양괴사인자 - α (tumor necrosis factor - α , 이하 TNF - α 라 함) 및 IL -12를 높은 수준으로 분비하도록 하였다. 또한 복강 내 대식세포나 B 세포에서도 IL -12를 분비하도록 유도하였다. 이러한 효과는 오직 CpG ODN들의 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 경우에만 나타나는 것으로 5' 말단에 결합한 경우에는 이를 관찰할 수 없었다.

한편, 면역세포의 표면에 존재하는 수용체 중 어떠한 수용체에 의해 dG 연속서열이 결합된 ODN의 세포 결합이 이루어지는지 실험하기 위해 다양한 리간드를 사용하여 경쟁적 결합양상을 조사한 결과, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 ODN의 세포 결합은 SR -A에 특이적인 리간드에 의해서만 저해되었으며, 이로부터 dG 연속서열이 결합된 ODN이 SR -A 리간드 특이성을 갖는 수용체를 경유하여 세포내로 유입됨을 알 수 있다.

본 발명에 의해 제조된 dG 연속서열을 갖는 CpG ODN들은 4개의 가닥으로 이루어진 나선구조(four-stranded helix)인 테트라플렉스(tetraplex) 구조를 만들어서 항원제시세포의 SR에 선택적으로 결합하고 그 결과 세포내의 CpG ODN들의 농도를 증가시킬 것으로 예상된다. 이러한 테트라플렉스 구조는 dG 연속서열에 의해 만들어지는 G-사중체(G-quartet)에 의해 안정화된다고 알려져 있으며, dG 연속서열과 결합한 CpG ODN이 APCs와 결합하고 유입되는 효율에 영향을 미친다. SR과의 결합에 의한 수용체 신호는 사이토카인의 생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 말레일-BSA(maleyl-bovine serum albumin)가 SR에 결합하면 생쥐의 대식세포에서 TNF- α 유전자의 전사가 촉진됨이 보고되어 있다. 그러나 이와는 반대로 골수세포에서 유래한 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 IL-12의 생산은 저해된다는 보고도 있다. 한편, 본 발명에서 단순히 G-사중체 자체만이 SR과 결합해서는 TNF- α 및 IL-12와 같은 사이토카인의 생산이 증가되지 않는 것으로 보인다. 이러한 사실은 dG₆ 연속서열은 갖고 있지만 CpG 모티프가 존재하지 않는 M1 또는 M16GC에 의해서는 전혀 사이토카인의 생산이 유도되지 않는 것으로부터 알 수 있다. 따라서 증가된 면역활성을 나타내도록 하기 위해서는 dG 연속서열이 ODN의 3' 말단에 결합하는 것은 물론 ODN 자체가 CpG 모티프를 갖는 것이 중요하다.

dG 연속서열의 길이는 최소한 테트라플렉스 구조를 이룰 수 있도록 적어도 4개의 연속적인 dG가 결합된 dG 연속서열이 필요하며, dG가 6개 결합한 경우가 IL-12의 분비에 가장 효과적이다. dG 연속서열의 길이가 계속 증가하는 경우 IL-12의 분비 정도는 큰 차이가 없으나, TNF- α 의 경우에는 dG가 15개 결합한 경우에 가장 높은 분비 정도를 나타낸다. 따라서 생체내에서 과량의 TNF- α 분비가 독성을 나타낼 수 있으므로 dG 연속서열의 길이는 최소한 4개 내지 15개 이하로 이루어지는 것이 바람직하다.

한편, 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN은 5' 또는 3' 말단의 염기 결합을 포스포로티오에이트 결합으로 변형함으로써 보다 증진된 사이토카인 분비활성을 나타낼 수 있다. 상기에서 포스포로티오에이트 결합으로 변형되는 것은 5' 또는 3' 말단에서 1~3개의 염기결합을 변형시키는 것이 바람직하다.

보다 바람직하게는 양쪽 말단에서 2개의 염기결합을 변형시킨 서열번호 18의 M21E를 이용할 수 있다.

본 발명의 실험에 8에 따르면, 3' 말단에 dG 연속서열이 도입된 포스포다이에스터 CpG ODN의 생체내 핵산 분해효소에 대한 저항성을 더욱 증가시키기 위해 본 발명의 dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 양쪽 말단에서 두 개의 염기결합을 포스포로티오에이트 결합으로 변형하여 수상돌기세포에서의 사이토카인 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 구체적으로 수상돌기세포에서의 IL-12 분비 유도 능력이 가장 뛰어난 M21의 양쪽 말단의 두 개의 염기를 각각 포스포로티오에이트 결합으로 치환한 뒤 생체의 실험을 통해 사이토카인 분비능력을 1826T 및 M21과 비교하였다. 그 결과 양쪽 말단 두 개의 염기에 포스포로티오에이트 결합이 도입된 CpG ODN은 포스포다이에스터 결합만으로 이루어진 M21보다 높은 IL-12 분비능력을 보임은 물론 모든 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 이루어진 1826T보다도 높은 수준으로 IL-12 분비 자극활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 양쪽 말단에만 포스포로티오에이트 결합을 도입함으로써 사이토카인 분비 자극활성을 더욱 높이고 핵산 분해효소에 대한 저항성을 더욱 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

본 발명에 의해 제조된 CpG ODN들은 백신 보조제(vaccine adjuvant) 및 면역치료제로 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 알레르기(allergy), 천식, 자가면역질환 등의 면역치료제 또는 AIDS, C형 만성 간염 등의 감염성 질병들에 대한 예방 및 치료 백신의 보조제로 이용될 수 있다. 이때 면역반응을 유도하고자 하는 항원과 상기 ODN들은 0.1 ~ 2.5 mg/kg의 양으로 2 ~ 4주 간격으로 2 ~ 3번 부입되는 것이 바람직하다. 또한 항원에 대한 ODN의 비율은 0.2 ~ 10인 것이 바람직하다. 항원들은 인체에 사용될 수 있는 백신 보조제인 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide)와 함께 혹은 단독으로 면역할 수 있고 근육주사(intramuscular) 또는 피하주사(subcutaneous)의 방법으로 투여될 수 있다. dG 연속서열의 3' 결합에 의해 효능성이 증가된 ODN M16, M21은 각각 생쥐에서 Th-1 면역반응인 IgG2a 생성 및 CD4⁺T 보조세포로부터 높은 인터페론- γ /인터루킨-4(IFN- γ /IL-4) 분비 비율을 나타낸다.

이하 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 > dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 CpG ODN들의 제조

dG 연속서열의 효과를 포스포다이에스터 골격(phosphodiester backbone)을 갖는 CpG ODN에서 규명하기 위하여 데옥시리보구아노신(deoxyriboguanosine) 연속서열로 추정되는 염기서열(putative dG run, GGGGCG)과 CpG 모티브인 AACGTT를 갖고 있는 적절한 염기서열을 탐색하였다. 그 결과 pUC19 내에 존재하는 암피실린 저항성 유전자인 *amp^r*의 2293 -2312번째 20개 염기로 이루어진 서열을 선택하였고, 이를 p19로 명명하였다. 또한 대조군으로 이미 면역활성 능력이 있다고 알려진 CpG ODN인 1826(Jakob, T. et al., J. Immunol. 161, 3042 -3049, 1998)을 각각 포스포로티오에이트 골격(phosphorothioate backbone, 이하 1826T라 함) 또는 포스포다이에스터 골격(phosphodiester backbone, 이하 1826D라 함)으로 GenoTech사에 합성을 의뢰하여 제조, 사용하였다. 상기 ODN들을 주형으로 하여 일부 염기가 치환되거나 dG 연속서열(dG run)을 3' 또는 5' 말단에 결합시킨 ODN들을 제조하였다.

상기와 같은 방법으로 하기 표 1에 나타난 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. 하기 표 1에서 밑줄은 각각의 ODN에 존재하는 CpG 모티프 부위를 나타내고, 대문자는 포스포다이에스터 결합을 소문자는 포스포로티오에이트 결합을 나타낸다.

[표 1]

본 발명에서 제조된 CpG ODN 들의 염기서열

명칭	서열번호	염기서열
1826T	1	5' tccatgacgttctctgacgtt3'
1826D		5' TCCATGACGTTCTCTGACGTT3'
p19	2	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
p19d	3	5' GGAAAACGTTCTTC 3'
M1	4	5' GGAAAAGCTTCTTCGGGGCG 3'
M7	5	5' GGAAAACGTTCTTCGCCCCG 3'
M13	6	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGCG 3'
M14	7	5' GGAAAACGTTCTTCGGCCCCG 3'
M15	8	5' GGAAAACGTTCTTCGGCGCG 3'
M16	9	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG 3'
M19	10	5' GGGGAAAACGTTCTTCGCCC 3'
M26	11	5' GGGGGGAAAACGTTCTTCGC 3'
M27	12	5' GGGGGGGGAAAACGTTCTT 3'
M20	13	5' GGGGGGTCCATGACGTTCTGACGTT3'
M21	14	5' TCCATGACGTTCTCTGACGTTGGGGGG 3'
M12	15	5' CTTAACGTTCT 3'
M22	16	5' CTTAACGTTCTGGGGGG 3'
M23	17	5' GGGGGGCTTAACGTTCT 3'

< 실험예 1 > dG 연속서열이 생쥐의 지라(spleen)에서 분리한 수상돌기세포(dendritic cell)로부터 사이토카인의 분비에 미치는 영향

상기 실시예에서 제조된 CpG ODN들의 면역활성 정도를 비교분석하기 위하여 생후 약 6~8주 정도의 C57BL/6 암컷 생쥐(대한실험동물센터)의 지라(spleen)로부터 수상돌기세포를 분리하여 CpG ODN들을 처리한 뒤 각각 종양괴사인자- α (TNF - α)와 인터루킨 -12(IL -12)의 분비정도를 조사하였다.

수상돌기세포의 분리는 기존의 보고(Singh, Net al., J. Immunol. 160, 4849 -4880, 1998; Ridge, J.P. et al., Science 271, 1723 -1726, 1996)에 약간의 변형을 통해 이루어졌다. 즉, 마우스의 비장세포(splenocytes)를 조직 배양 플레이트에 90분간 부착시킨 후, 비부착성 세포(non-adherent cells)를 제거한 다음, 부착성 세포(adherent cells)에 10 ng/ml의 재조합 생쥐 GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, R&D System) 존재하에 하룻동안 배양하였다. 배양후 비부착성 세포 및 약한 부착성 세포들을 퍼콜 농도 구배(percoll density gradient)로 분리한 다음, 경계면으로부터 수상돌기세포들이 많은 저밀도 세포층을 수집하여 사용하였다. 1×10^5 개의 수상돌기세포에 각각의 CpG ODN들을 1.5 μ M의 농도로 처리하고 10시간과 30시간 뒤에 각각 배양액을 수거하여 분비된 TNF- α 및 IL-12 양을 상용 ELISA 키트들(Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development System, TOTAL MOUSE IL-12 DuoSet ELISA Development System; Genzyme)을 이용하여 측정하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

양성 대조군으로는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, 이하 LPS라 함)를 사용하였고, 음성 대조군으로는 배지만을 사용하여 IL-12 및 TNF- α 의 양을 정량하였다.

[표 2]

수상돌기세포에서의 사이토카인(IL-12, TNF- α) 생산에 미치는 영향

명칭	서열번호	IL-12 (ng/ml)	TNF- α (pg/ml)
1826T	1	5.41 \pm 1.28	2768 \pm 628
1826D		0.37 \pm 0.07	134 \pm 58
p19	2	1.32 \pm 0.31	640 \pm 96
p19d	3	0.07 \pm 0.01	25 \pm 3
M1	4	0.05 \pm 0.01	27 \pm 3
M7	5	0.09 \pm 0.02	30 \pm 3
M13	6	0.07 \pm 0.01	20 \pm 1
M14	7	0.05 \pm 0.01	22 \pm 2
M15	8	0.08 \pm 0.02	36 \pm 5
M16	9	2.40 \pm 0.77	960 \pm 166
M19	10	0.13 \pm 0.05	39 \pm 6
M26	11	0.13 \pm 0.07	96 \pm 26
M27	12	0.07 \pm 0.03	64 \pm 19
M20	13	0.42 \pm 0.11	115 \pm 29
M21	14	3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176
M12	15	0.05 \pm 0.01	18 \pm 3
M22	16	0.88 \pm 0.17	408 \pm 55
M23	17	0.05 \pm 0.01	40 \pm 5
LPS		1.59 \pm 0.25	844 \pm 154
배지		0.07 \pm 0.01	27 \pm 4

상기 표 2에 나타나 있듯이 포스포로티오에이트 변형(1826T)이 포스포다이에스터(1826D)에 비해 월등히 뛰어난 사이토카인 분비를 나타냈다. 그러나 p19는 1826D에 비해 약 네 배 정도 높은 IL-12 분비를 보였다. 또한 이러한 높은 수준의 사이토카인 분비는 dG로 구성된 연속서열(GGGGCG)에서 일부 dG를 dC로 치환하거나(M7, M13, M14, M15), 제거했을 때(p19d) 현저하게 감소함을 알 수 있다. 또한 p19의 dG로 구성된 연속서열의 dC를 dG로 치환하였을 때(M16) 그 활성이 더욱 증가하였다. 이러한 dG로 구성된 연속서열의 효과는 서로 다른 염기서열 혹은 다른 길이를 갖고 있는 CpG ODN에서도 마찬가지로 나타났다. 즉, M21과 M22가 1826, M12에 비해 현저히 높은 TNF- α 및 IL-12 분비를 나타내었다. 특히 dG 연속서열을 5' 말단에 결합시킨 경우(M19, M26, M27)에는 사이토카인 분비에 효과가 없는 것으로 나타나 결론적으로 dG 연속서열의 효과는 CpG ODN의 3' 말단에 있을 때에만 선택적으로 나타나는 것임을 알 수 있다.

< 실험에 2> 복강 대식세포와 B 세포에서 dG 연속서열의 효과

수상돌기세포와 마찬가지로 대식세포 또는 B 세포에서도 dG ODN이 사이토카인의 분비를 촉진하는지 알아보기 위하여 생쥐의 복강 대식세포 및 지라에서 얻은 B 세포에 대해 실험에 1과 같은 방법으로 실험하였다.

복강 대식세포는 생후 약 6~8주 정도의 C57BL/6 암컷 생쥐(대한실험동물센터)의 복강을 배지로 세척하고 이를 조직 배양 플레이트에 접종하여 9시간 동안 배양한 뒤에 배지로 3회 세척하여 부착성 세포들만 분리, 사용하였다. 또한 B 세포는 생쥐의 지라에서 비부착성 세포들을 분리한 뒤 B 세포에 특징적인 세포 표면 표지(surface marker)인 CD19(complement differentiation 19)을 인식하는 마이크로비드(microbead, Miltenyl Biotech)를 결합시키고 이를 미니(mini)MACS 칼럼(Miltenyl Biotech)을 사용하여 분리하였다. 1×10^5 수의 대식세포와 2×10^5 의 B 세포에 각각 $3 \mu\text{M}$ 의 CpG ODN을 처리한 후 30시간 뒤에 그 배양액을 얻어 IL -12 ELISA를 수행하였다.

그 결과 수상돌기 세포에서와 마찬가지로 생쥐의 복강 대식세포(microphage)와 지라로부터 분리한 B 세포에 CpG ODN들을 처리하였을 때에도 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 ODN만 높은 정도로 IL -12를 분비하는 것으로 나타났다. 특히 M16과 M21은 다른 ODN에 비해 현저히 높은 IL -12 분비유도활성을 나타내었다(도 1a 및 1b 참조).

< 실험에 3> 3' 말단에 결합된 dG로 구성된 연속서열의 길이에 따른 효능성 변화

p19의 dG로 구성된 연속서열(GGGGCG)을 제거한 p19d를 대조군으로 하여 그 3' 말단에 다양한 길이의 dG 연속서열을 결합시킨 다음, 수상돌기세포에서 사이토카인의 분비정도를 측정하였다. 구체적인 실험과정은 상기 실험에 1의 방법을 따랐다. 그 결과들도 2에 나타내었다.

도 2의 결과로부터 알 수 있듯이, 사이토카인의 분비에는 적어도 4개의 연속적인 dG로 이루어진 dG 연속서열이 필요하고, 특히 테옥시리보구아노신이 6개 결합한 dG₆ 일 때 IL -12의 분비가 가장 효과적인 것으로 나타났다. dG 연속서열의 길이가 계속 증가하는 경우 IL -12의 분비정도는 큰 차이가 없었으나, TNF - α 의 경우 dG₁₅ 일 때 가장 높은 분비정도를 나타내어 dG₆가 결합된 ODN에 비해 약 5배 정도 더 높은 값을 나타내었다.

이러한 결과로부터 3' 말단에 결합된 dG 연속서열의 길이에 따라 TNF - α 와 IL -12의 분비정도를 변화시킬 수 있음을 알 수 있다.

< 실험에 4> dG 연속서열의 결합에 따른 ODN들의 세포 결합 및 세포내 유입정도 변화

(4 -1) dG 연속서열이 ODN의 세포결합에 미치는 영향

CpG ODN의 효과적인 활성을 위해선 세포 내로 많은 양의 ODN이 유입되어야 한다. 따라서 수상돌기세포에 결합하는 정도나 세포 내로 유입되는 정도가 dG 연속서열의 결합에 의해 어떻게 변화하는지 조사하였다.

용이한 관찰을 위해 CpG ODN의 3' 혹은 5' 말단에 형광물질인 플루오레신(fluorescein)을 결합시킨 fODN들을 이용하였다. 세포에 결합하는 fODN의 양은 1×10^5 의 수상돌기세포에 $5 \mu\text{M}$ 의 fODN들을 4. C에서 한시간 동안 처리한 뒤 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 결합하지 않은 fODN들을 제거하고 FACS(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 형광광도를 측정하였다. 세포 내로 유입된 fODN의 양은 1×10^5 의 수상돌기세포에 $1 \mu\text{M}$ 의 fODN들을 4. C에서 30분 처리하고 37. C에서 각각 1.5 또는 6시간 동안 배양한 후 세포막에 부착된 fODN을 제거하고 측정하였다. 각각의 ODN이 수상돌기세포에 결합하는 정도 및 세포내로 유입되는 정도를 평균형광강도(mean fluorescent intensity, 이하 MFI라 함)로 측정하되, 배지만 존재할 때의 MFI를 기준으로 하여 fM21이 존재할 때의 MFI의 증가정도를 상대적인 지수로 나타낸 결합지수(binding index)와 유입지수(internalization index)로 나타내었다.

그 결과들도 3과 같다. 즉, 3' 혹은 5'에 dG 연속서열이 결합된 경우 ODN의 세포 결합(도 3a) 및 세포 내 유입(도 3b)은 dG 연속서열이 없는 ODN들의 경우에 비해 현저하게 증가하였다. 한편 dG 연속서열이 3' 말단 위치에 있는 경우가 5' 말단 위치에 결합한 경우보다 세포 결합 및 세포내 유입 면에서 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 또한 이러한 효과는 dG 연속서열이 dC 연속서열로 바뀌면 사라지는 것으로 보아 dG 연속서열의 특이적인 효과임을 알 수 있다.

(4 -2) dG ODN과 결합하는 수용체의 탐색

dG 연속서열을 포함한 ODN들의 세포표면에 결합하는 능력이 어떠한 수용체에 의해 이루어지는가를 조사하기 위하여 기존에 여러 수용체에 결합한다고 알려진 리간드들을 함께 처리하는 경쟁적 결합 분석(competitive binding assay)을 수행하였다. 즉, SR -A의 리간드로 dG₂₀, 푸코이단(fucoidan, Sigma), 텍스트란 설페이트(dextran sulfate, Sigma)를, SR -BI의 리간드로 LDL(low density lipoprotein, Sigma)을, CD36의 리간드로 올레산(oleic acid, Sigma)을, Mac -1(CD11b/CD18, α M β 2)의 리간드로 피브리노젠(fibrinogen, Sigma)과 항 CD18 단일클론항체(Pharmingen) 등을 사용하였다. 우선 0.25mg/ml 농도의 리간드 각각과 10 μ M 농도의 dG₂₀을 1 μ M 농도의 fM21과 공동배양한 후, 결합된 fM21로부터의 MFI를 측정하여 각각의 리간드가 ODN의 세포결합에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 SR -A에 특이적인 리간드들만 dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 fM21 ODN의 수상돌기세포에의 결합을 저해할 수 있었다(도 3c참조). 이러한 결과는 dG 연속서열이 SR -A 리간드 특이성을 갖는 수용체를 경유하여 세포 내로 유입됨을 나타낸다.

< 실험예 5 > 5' 말단에 결합된 dG 연속서열에 의한 사이토카인 분비 능력 저해

실험예 1의 결과에서 나타나듯이 5' 말단에 dG 연속서열을 결합한 경우는 수상돌기세포로부터 사이토카인 분비를 전혀 증가시키지 못했다(표 2; M19, M26, M27). 그러나 5' dG 연속서열도 테트라플렉스(tetraplex) 구조 형성이나 수상돌기세포 결합정도는 dG 연속서열이 없는 ODN의 경우에 비해 현저히 높음을 알 수 있었다(실험예 4). 이러한 결과는 dG 연속서열의 작용이 CpG ODN의 어느 위치에 있느냐에 따라 변화될 수 있음을 나타낸다. 본 실험예에서는 dG 연속서열이 CpG ODN과 결합한 위치에 따른 영향을 조사하기 위하여 양이온성 리포솜(cationic liposome)인 리포젠TM(lipogeneTM, BodiTech, Korea)을 CpG ODN과 함께 수상돌기세포에 처리하여 세포 내로 유입되는 CpG ODN의 양을 dG 연속서열의 유무에 상관없이 동일화시킨 뒤 실험하였다. 또한, dG 연속서열의 위치에 따른 영향을 조사하기 위하여 2개의 CpG 모티프만을 갖는 서열번호 2의 1826D와 1개의 CpG 모티프만을 갖는 서열번호 16의 M12를 대조군으로 하여, 각각 3' 말단에 dG 연속서열이 결합한 CpG ODN(M21, M22)과 5' 말단에 dG 연속서열이 결합한 CpG ODN(M20, M23)이 수상돌기세포에서의 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 수상돌기세포에 0.3 μ M의 CpG ODN들을 3 μ g의 리포젠과 함께 상온에서 30분 배양한 혼합액을 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 그 뒤 배양액에 남아있는 리포젠-ODN 혼합체를 제거하고, 다시 24시간 동안 더 배양한 뒤 배양액으로부터 IL -12의 양을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

dG 연속서열의 결합위치에 따른 사이토카인 분비 영향

명칭	dG run위치	IL -12(ng/ml) - 리포솜	TNF - α (pg/ml) - 리포솜	IL -12(ng/ml) + 리포솜
1826D	-	0.37 \pm 0.07	134 \pm 58	4.15 \pm 1.17
M21	3'	3.04 \pm 0.57	1103 \pm 176	8.11 \pm 2.19
M20	5'	0.42 \pm 0.11	115 \pm 29	1.74 \pm 0.57
M12	-	0.05 \pm 0.01	18 \pm 3	1.68 \pm 0.33
M22	3'	0.88 \pm 0.17	408 \pm 55	7.89 \pm 3.21
M23	5'	0.05 \pm 0.01	40 \pm 5	0.86 \pm 0.25
* - : dG 연속서열이 결합되지 않음				

그 결과, 3' 말단에 dG 연속서열이 없는 경우도 리포솜과 함께 처리할 때 수상돌기세포로부터 높은 정도로 IL -12를 분비하게 한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 5' 말단에 dG 연속서열이 있는 경우(M20, M23)에는 오히려 dG 연속서열이 없는 경우(1826D, M12)에 비해 더 낮은 정도로 IL -12를 분비함을 알 수 있었다. 이 결과는 5' dG 연속서열은 오히려 수상돌기세포로부터 CpG 모티프에 의해 유도되는 IL -12 분비 능력을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

< 실험예 6 > 3' 말단에 결합된 연속서열의 염기종류에 따른 영향

M16의 dG 연속서열 대신 데옥시리보아데닌 (dA), 데옥시리보사이토신 (dC) 및 데옥시리보티민 (dT)으로 구성된 연속서열을 CpG ODN의 3' 말단에 결합시킨 후 (M16 -A, M16 -C, M16 -T), 각각의 CpG ODN이 단독으로 혹은 리포솜과 함께 전달될 때 수상돌기세포로부터 IL -12 및 TNF - α 의 분비에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[표 5]

연속서열의 염기 종류에 따른 영향

명칭	서열		TNF - α (pg/ml) - 리포솜	IL -12 (ng/ml) + 리포솜
M16	5' GGAAAACGTTCTTCGGGGGG3'	2.40 \pm 0.77	960 \pm 166	4.76 \pm 1.65
M16 -A	5' GGAAAACGTTCTTCAAAAAA3'	0.05 \pm 0.01	25 \pm 2	5.56 \pm 1.10
M16 -T	5' GGAAAACGTTCTTCTTTTTT3'	0.06 \pm 0.01	29 \pm 3	5.11 \pm 0.88
M16 -C	5' GGAAAACGTTCTTCCCCCCC3'	0.06 \pm 0.01	45 \pm 8	4.35 \pm 0.52
M16 -GC	5' GGCCCCGCTTCTTCGGGGGG3'	0.08 \pm 0.02	31 \pm 2	0.15 \pm 0.03

그 결과, 리포솜 없이 단독으로 수상돌기세포에 처리된 경우 CpG 모티프를 갖는 동시에 dG 연속서열이 3' 위치에 결합한 M16만 dG 연속서열 대신 dA, dC 또는 dT 연속서열이 결합한 CpG ODN들 (M16 -A, M16 -T, M16 -C)에 비해 현저하게 높은 사이토카인 분비자극활성을 나타내었다. 한편 3 μ g의 리포솜과 함께 투여된 경우에는 비슷한 IL -12 분비양상을 나타내었으나, 이 경우에도 CpG 모티프의 존재가 면역활성 증가에 필수적인 것으로 나타났다. 이 결과는 3' 말단에 결합된 dG 연속서열은 CpG ODN들의 세포내로의 유입에만 관여하고, 세포내에서 사이토카인 분비에 관계된 신호전달에 있어서는 큰 작용을 하지 않는 것을 나타낸다.

< 실험에 7> 생체내에서 dG 연속서열 결합에 의한 CpG ODN의 면역활성 변화

(7 -1) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 면역반응 유발효과 (항원: HIV)

dG 연속서열에 의한 CpG ODN의 면역활성 능력이 생체내에서도 적용될 수 있는지를 조사하기 위하여 Balb/c 생쥐에서 dG 연속서열이 결합된 포스포다이에스터 CpG ODN에 의해 유발되는 면역활성을 조사하였다. 일반적으로 포스포로티오에이트 골격을 갖는 CpG ODN만이 항원과 함께 주입되었을 때 면역반응을 주로 Th -1 면역반응 쪽으로 유도한다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에에서는 dG 연속서열을 3' 말단에 결합한 포스포다이에스터 골격을 갖는 CpG ODN이 이와 유사하게 면역조절을 할 수 있는지를 조사함으로써 dG 연속서열의 효과를 생체내에서 조사하였다.

알루미늄 하이드록사이드 (aluminum hydroxide, Sigma)로 미리 처리한 인간 면역결핍 바이러스 입자 [human immunodeficiency virus (HIV) particle] 5 μ g/mouse과 50 μ g/mouse의 M16 CpG ODN을 함께 혼합하여 6 -8 주령의 Balb/c 암컷 생쥐 (대한실험동물센터)에 피하주사로 주입하였다. 모든 생쥐는 첫 번째 면역 4주 뒤에 부스팅 (boosting)을 하고 그 후 2주 뒤에 체액성 면역반응을 ELISA 분석을 통해 조사하였다. ELISA 분석은 항 HIV IgG 반응을 특이적으로 관찰하기 위하여 HIV 입자를 항원으로 이용하였고, 양고추냉이 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase, HRP)가 결합되어 있는 항 -마우스 IgG, IgG1 및 IgG2a (Southern Biotechnology, USA)를 각각 이차 항체로 사용하였다. 발색반응은 테트라메틸 -벤지딘 (tetramethyl -benzidine, TMB) 용액을 기질 (Sigma)로 사용하여 수행하였다.

그 결과로도 4a에 도시하였다. 3' 말단에 dG 연속서열이 결합된 M16을 HIV 입자와 함께 처리한 경우 전체 면역글로블린G (IgG)와 대표적인 Th -1 면역반응인 IgG2a 반응 모두 확률적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 3' 말단에 dC 연속서열이 있는 경우나 CpG 대신 GpC가 있는 ODN (M16C, M16GC)들을 함께 주입한 경우 그 효과가 미미하였다 (도 4a참조). 이 결과는 M16 ODN이 Th -1 면역반응을 효과적으로 증가시켰음을 나타내고 그 효과는 M16의 CpG 모티프와 3' 말단의 dG 연속서열에 의존적임을 시사한다.

(7 -2) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 체액성 면역반응 유발효과 (항원: gDE2t)

일반적으로 포스포로티오에이트 골격을 갖는 CpG ODN만이 항원과 함께 주입되었을 때 면역반응을 주로 Th -1 면역 반응 쪽으로 유도한다고 알려져 있다. 따라서 dG 연속서열 결합에 의한 면역조절 효과를 더욱 상세히 조사하기 위하여 다음으로 이미 기존에 그 효과가 잘 알려진 포스포로티오에이트 골격의 ODN인 1826T를 비교군으로 하여 1826D와 1826D의 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시킨 M21의 효과를 비교 분석하였다. 항원으로는 C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV)의 당단백질인 E2 단백질에 헤르페스 심플렉스 (herpes simplex virus, HSV)의 당단백질 gD가 융합된 형태의 gDE2t를 사용하였다. 또한 ODN의 면역조절 효과를 보다 정확히 관찰하기 위하여 알루미늄 하이드록사이드 (alum)를 사용하지 않고 비교적 작은 양 ($2 \mu\text{g}/\text{생쥐}$)의 CpG ODN을 주입하였다. 면역 방법은 중국 햄스터 난소 세포 (CHO)로부터 분리한 $5 \mu\text{g}$ 의 gDE2t 단백질을 $2 \mu\text{g}$ 의 ODN (1826D, 1826T, M21)과 함께 근육주사를 통해 B alb/c 생쥐에 주입하고 역시 4주 뒤에 부스팅 (boosting)을 하고 그 후 2주 뒤에 체액성 면역반응을 조사하였다. ELIS A 분석은 항 -E2t IgG2a 반응을 특이적으로 관찰하기 위하여 CHO에서 유래된 Hgh -E2t 단백질을 항원으로 이용하였고 HRP가 결합되어 있는 항 -마우스 IgG2a를 이차 항체로 이용하였다. 그 결과들도 4b에 나타내었다.

대표적인 Th -1 면역반응인 IgG2a 역가를 조사하였을 때 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN인 1826D는 E2에 대해 매우 낮은 IgG2a 역가를 보였다. 그러나 포스포로티오에이트 골격으로 변형된 1826T는 기존의 보고와 마찬가지로 높은 IgG2a 역가를 나타냈다. 1826D의 3' 말단에 dG 연속서열을 결합시킨 M21의 경우에는 1826D에 비해 약 50배 정도 높은 IgG2a 반응을 보였다. 이 결과는 상기 (7 -1)의 결과와 일치한다고 할 수 있다. 즉 dG 연속서열의 결합에 의해 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN의 Th -1 면역반응 유도 능력이 증가되었다.

(7 -3) dG 연속서열이 결합된 CpG ODN의 세포성 면역반응 유발효과 (항원: gDE2t)

이를 더욱 자세히 조사하기 위해 면역된 생쥐의 지라로부터 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 세포를 분리하여 활성화시켰을 때 분비되는 사이토카인을 조사하였다. 2×10^5 의 $\text{CD4}^+ \text{T}$ 세포에 중국 햄스터 난소세포 (chinese hamster ovary, CHO)에서 분리된 E2t 항원을 각각 1 또는 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 37°C 에서 5일 동안 배양하였다. 배양액으로부터 Th -1 면역반응의 대표적인 사이토카인인 IFN - γ 와, Th -2 면역반응의 대표적인 사이토카인인 IL -4의 분비정도를 비교함으로써 면역반응의 타입을 결정하였다. 도 4c에서 볼 수 있듯이 1826D에 비해 M21을 함께 주입한 경우 높은 IFN - γ /IL -4 비율을 보인다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 1826T를 주입한 경우도 관찰되었다. 즉, dG 연속서열의 결합으로 인해 포스포다이에스터 골격의 CpG ODN의 면역조절 능력이 포스포로티오에이트 골격으로의 변형과 유사한 방식으로 면역반응을 Th -1 쪽으로 유도함을 알 수 있다.

< 실험예 8 > ODN 양쪽 말단에 포스포로티오에이트 변형의 도입에 의한 사이토카인 분비 능력 향상

3' 말단에 dG 연속서열이 도입된 포스포다이에스터 CpG ODN의 생체내 핵산 분해효소 저항성을 더욱 증가시키기 위해 본 실험에서는 포스포다이에스터 CpG ODN의 양쪽 말단 두 개의 염기결합을 포스포다이에스터 결합에서 포스포로티오에이트 결합으로 변형하였다. 수상돌기세포에서 가장 높은 정도로 IL -12를 분비시킨 M21의 양쪽 끝 두 개의 염기를 각각 포스포로티오에이트 결합으로 치환한 뒤 (M21E) 생체의 실험을 통해 IL -12의 분비능력을 1826T 및 M21과 비교 분석하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다. 하기 표에서 소문자는 포스포로티오에이트 결합을, 대문자는 포스포다이에스터 결합을 나타낸다.

[표 6]

양쪽 말단을 포스포로티오에이트 결합으로 치환시 사이토카인 분비에 미치는 영향

명칭	서열번호	서열	IL -12(ng/ml)
1826T	1	5' tccatgacgttcctgacgtt3'	5.41 ± 1.28
M21	14	5' TCCATGACGTTTCCTGACGTTGGGGGG 3'	3.04 ± 0.57
M21E	18	5' tcCATGACGTTTCCTGACGTTGGGGgg 3'	6.03 ± 2.19

그 결과, M21의 양쪽 말단 두 개의 염기에 포스포로티오에이트 결합을 도입한 M21E는 M21에 비해 두 배 정도 높고 또한 수상돌기세포에서 가장 높은 IL -12 분비 능력을 보였던 1826T에 비해서도 더 높은 수준으로 IL -12 분비자극 활성을 나타내었다. 이 결과는 양쪽 끝 부분만 포스포로티오에이트 변형을 도입함으로써 사이토카인 분비자극활성을 더욱 높이고 핵산 분해효소 저항성을 더욱 증가시킬 수 있음을 보여준다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 dG 연속서열이 3' 말단에 결합된 변형된 포스포다이에스터 CpG ODN은 높은 T h -1 면역반응 유도활성을 보이며, 기존에 알려진 포스포로티오에이트 골격으로 변형된 CpG ODN과는 달리 생체내에서 독성을 나타내지 않아 안전성이 뛰어나므로 효과적인 백신 보조제 및 면역치료제로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

면역활성을 갖는 포스포다이에스터 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)에 있어서, 데옥시리보구아노신(dG) 연속서열이 결합된 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 2.

제 1항에 있어서, ODN은 CpG 모티프를 갖는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 3.

제 1항에 있어서, dG 연속서열은 ODN의 3' 말단에 결합한 것으로 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4.

제 1항에 있어서, dG 연속서열은 4 내지 15개 이하의 뉴클레오타이드 길이를 가지며, 최소한 4개 이상의 dG가 연속되어 있는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 5' 또는 3' 말단의 1~3 개의 포스포다이에스터 뉴클레오타이드 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 치환된 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6.

제 1항에 있어서, ODN은 SR(scavenger receptor)을 갖는 면역세포에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 수상돌기세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), B 세포를 포함하는 항원제시세포(antigen presenting cells)에 특이적으로 작용하는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 수상돌기세포로부터 IL -12, TNF - α 분비를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드.

청구항 9.

제 1항 또는 제 5항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 9, 서열번호 14, 서열번호 16 또는 서열번호 18로 표시되는 염기 서열을 갖는 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드.

청구항 10.

제 1항의 dG가 수식된 올리고뉴클레오티드를 유효성분으로 하는 백신 보조제 또는 면역 치료제.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 다른 항원과 함께 추가적으로 사용되는 것을 특징으로 하는 백신 보조제 또는 면역 치료제.

청구항 12.

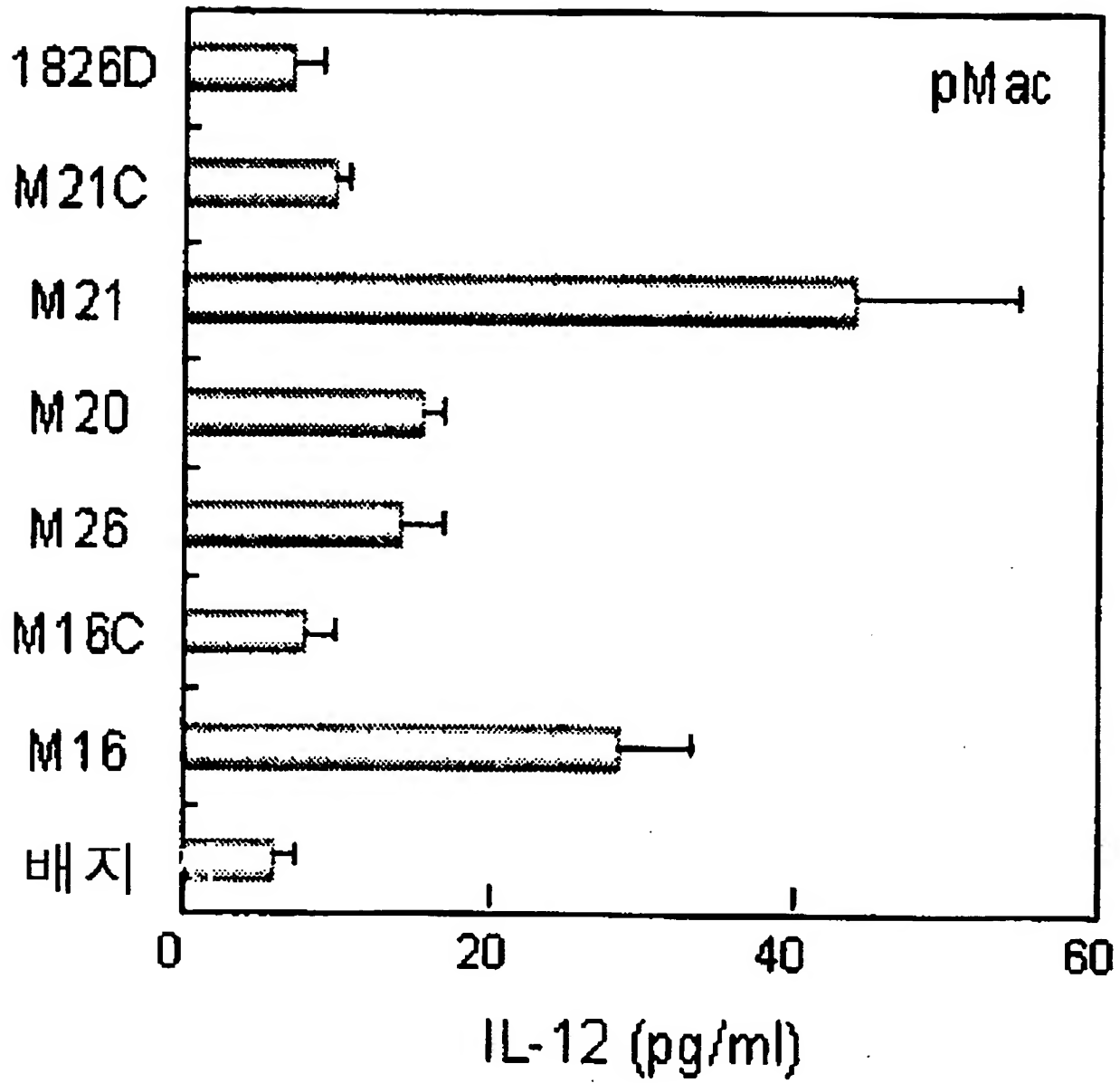
제 10항 또는 제 11항에 있어서, 상기 백신은 AIDS, 만성 C 형 간염 등의 질병을 예방 또는 치료를 위한 것임을 특징으로 하는 백신 보조제.

청구항 13.

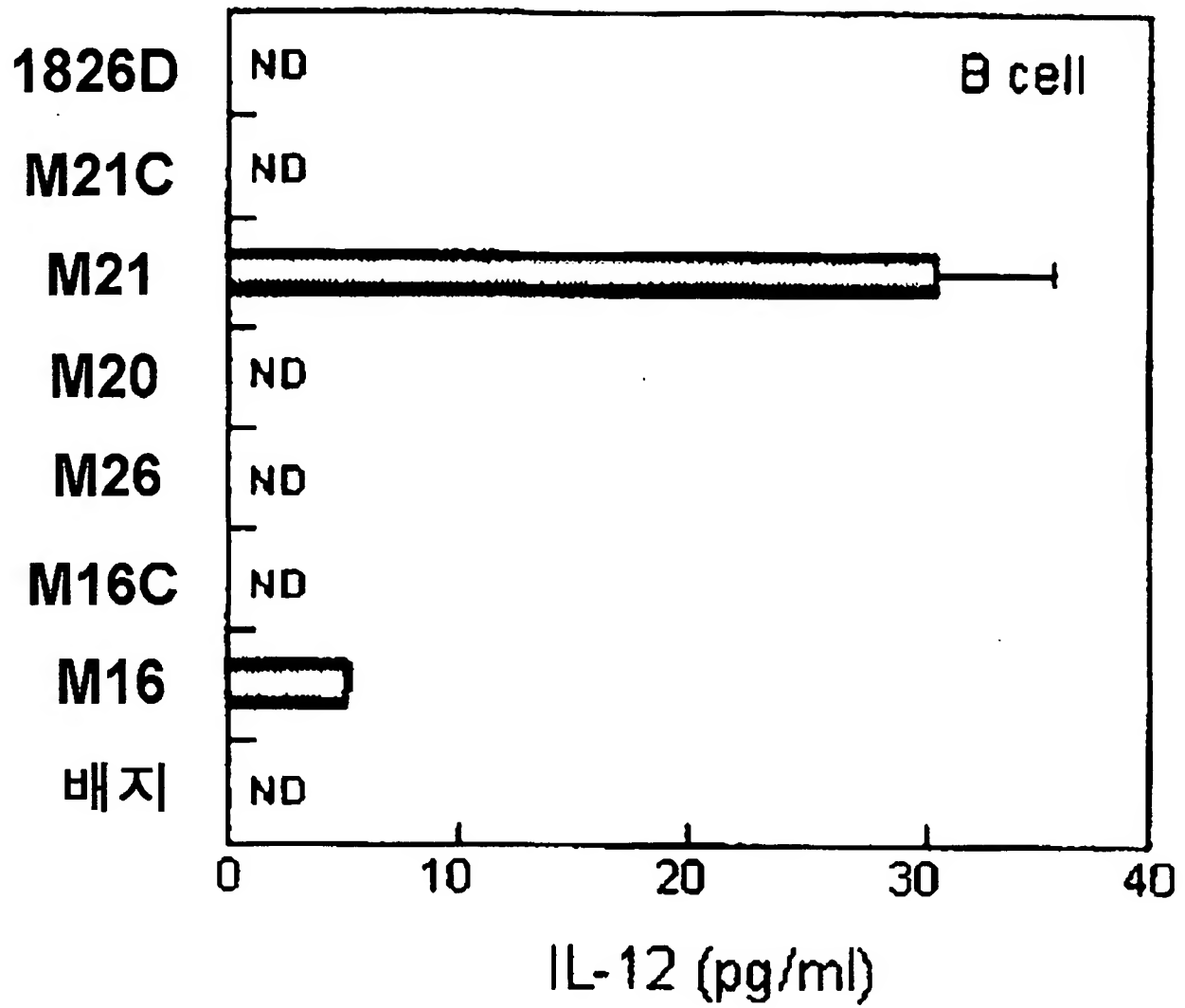
제 10항 또는 제 11항에 있어서, 상기 치료제는 알레르기, 천식, 자가면역질환의 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 면역치료제.

도면

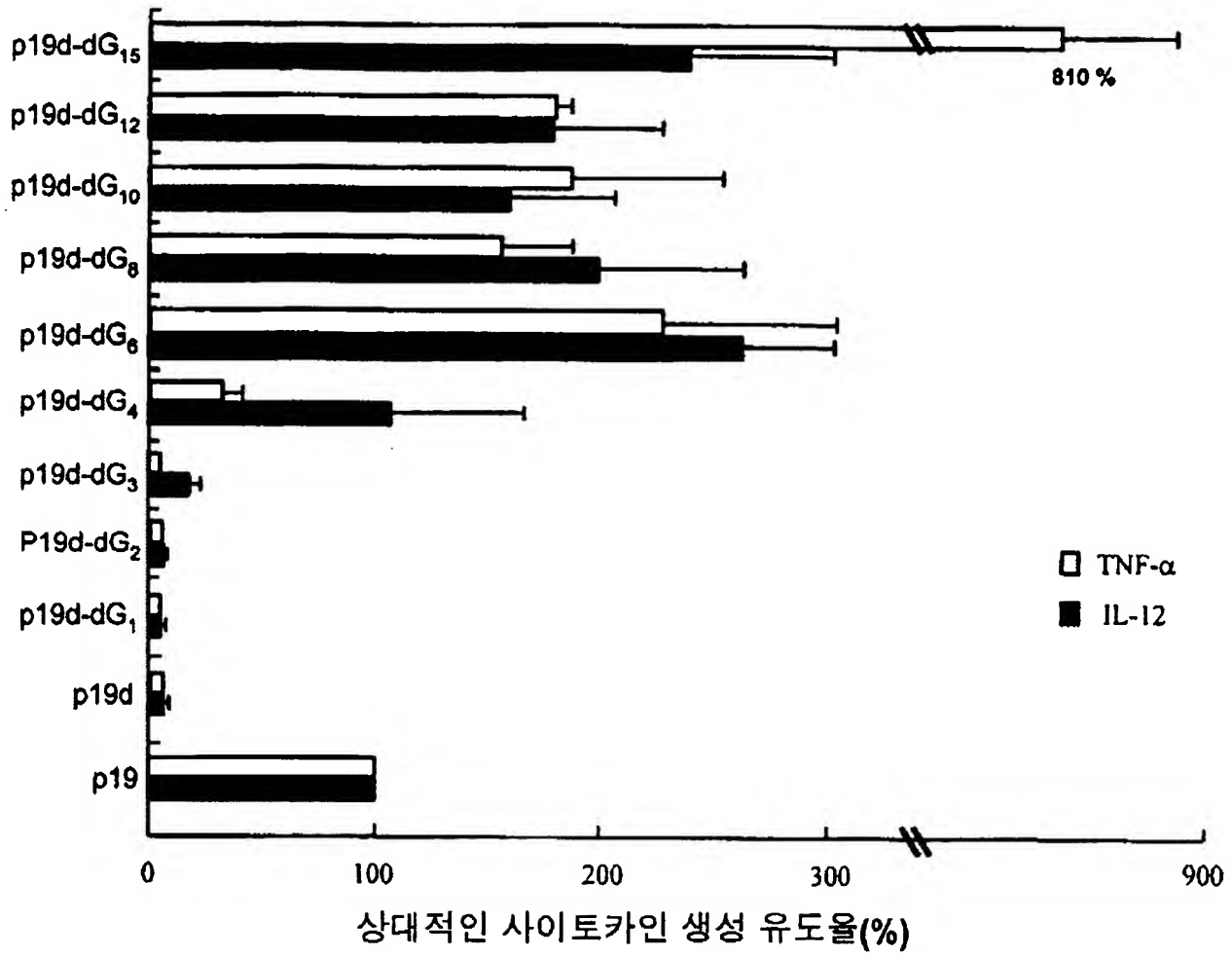
도면 1a



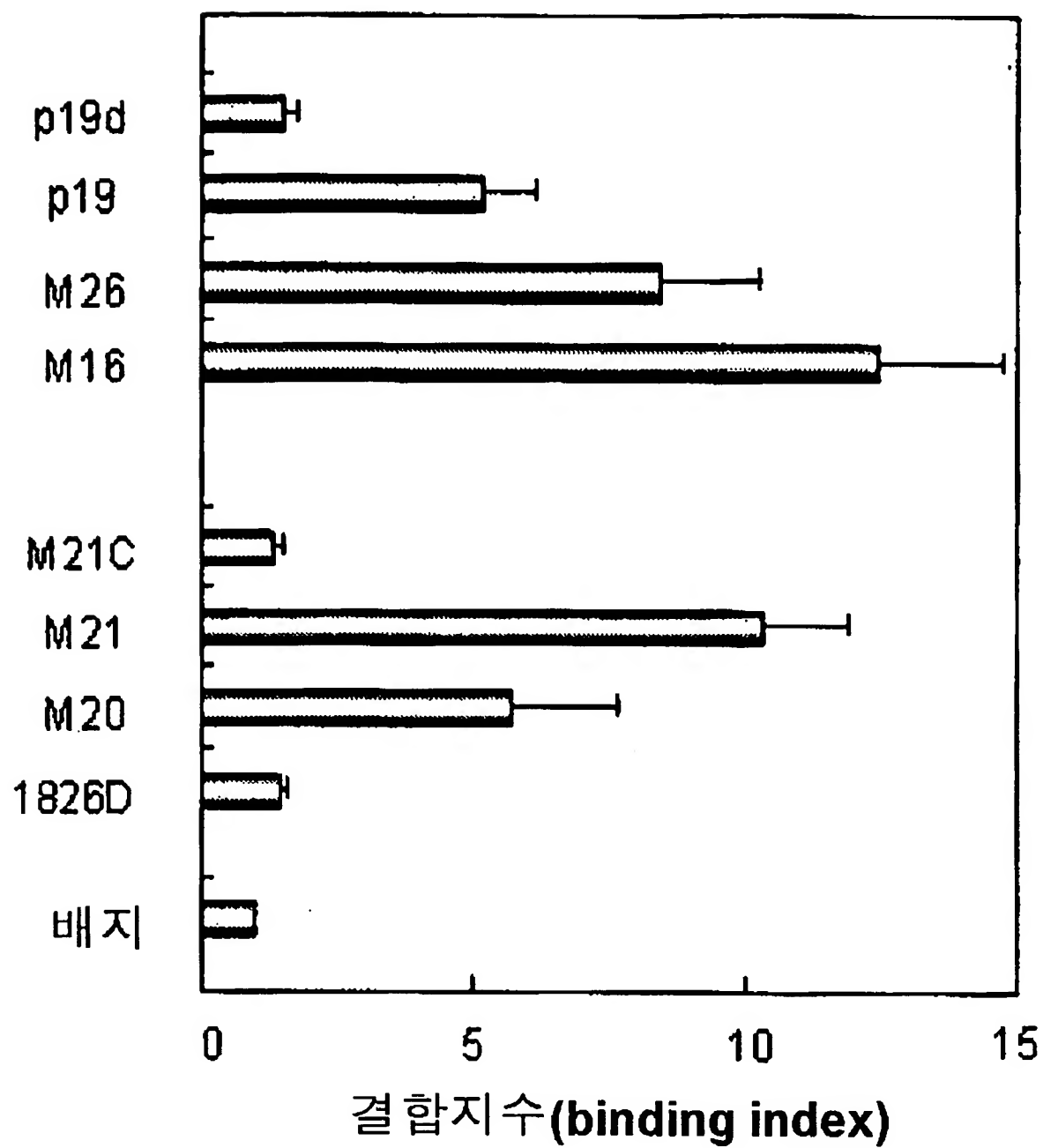
도면 1b

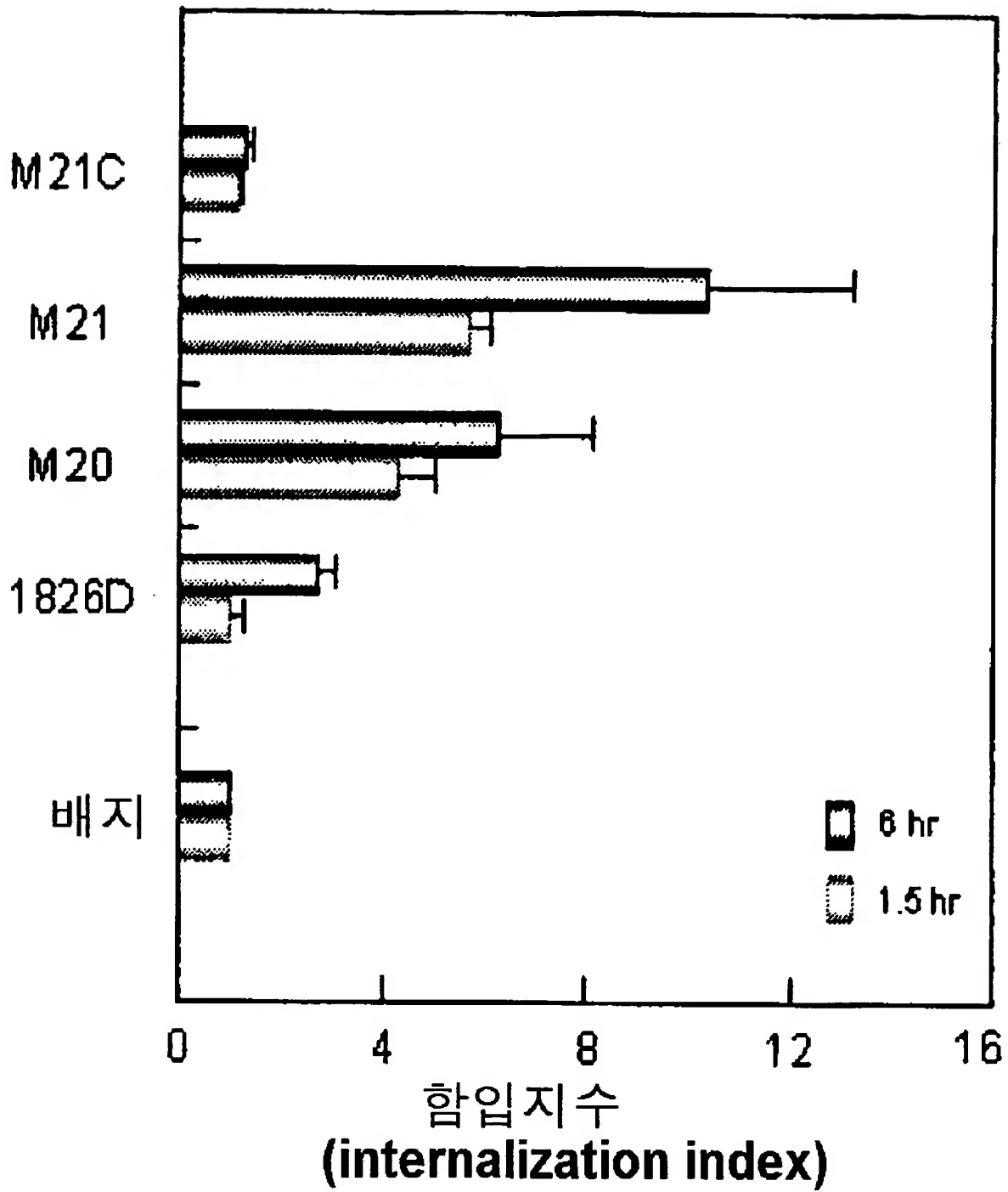


도면 2

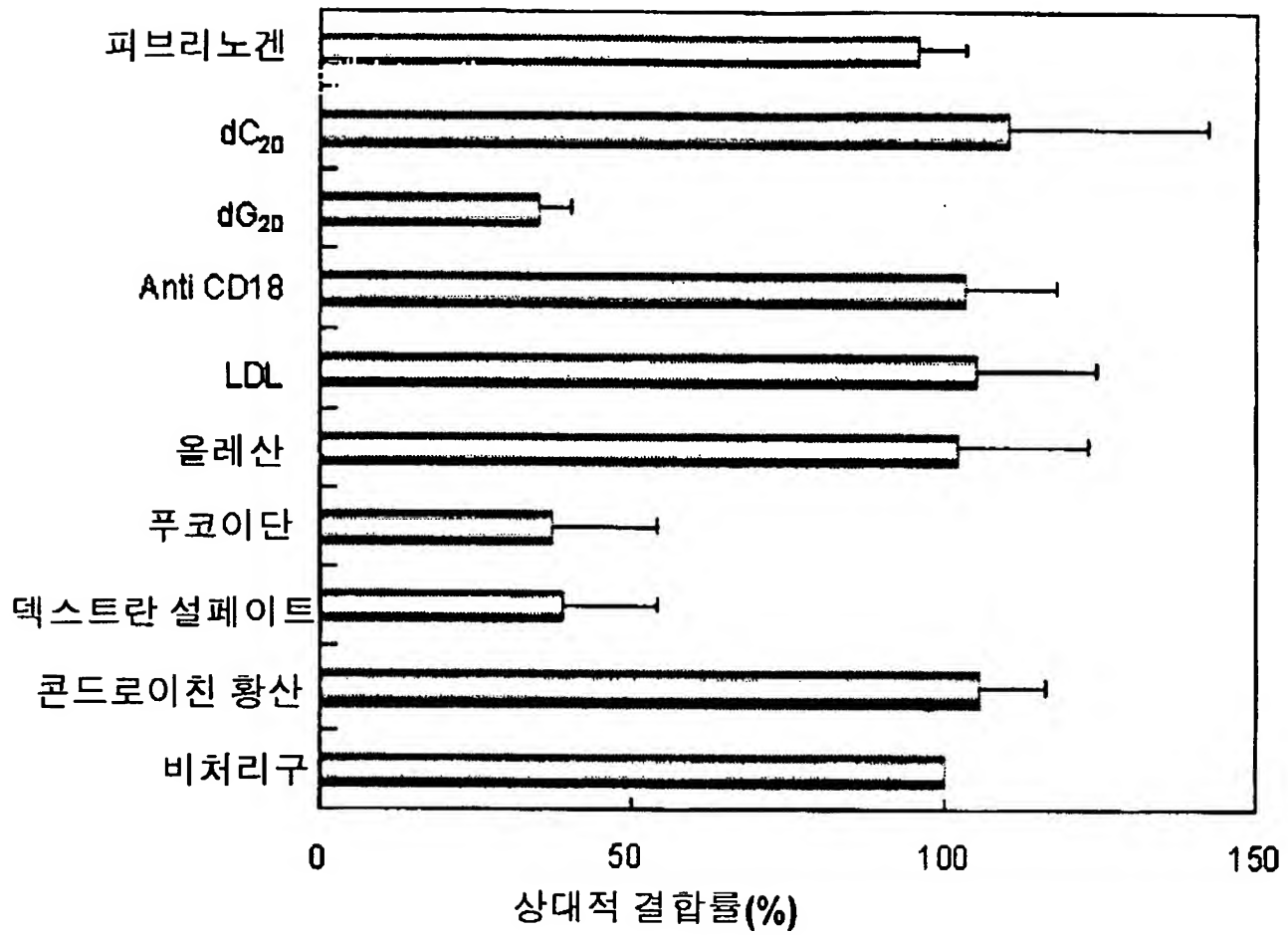


도면 3a

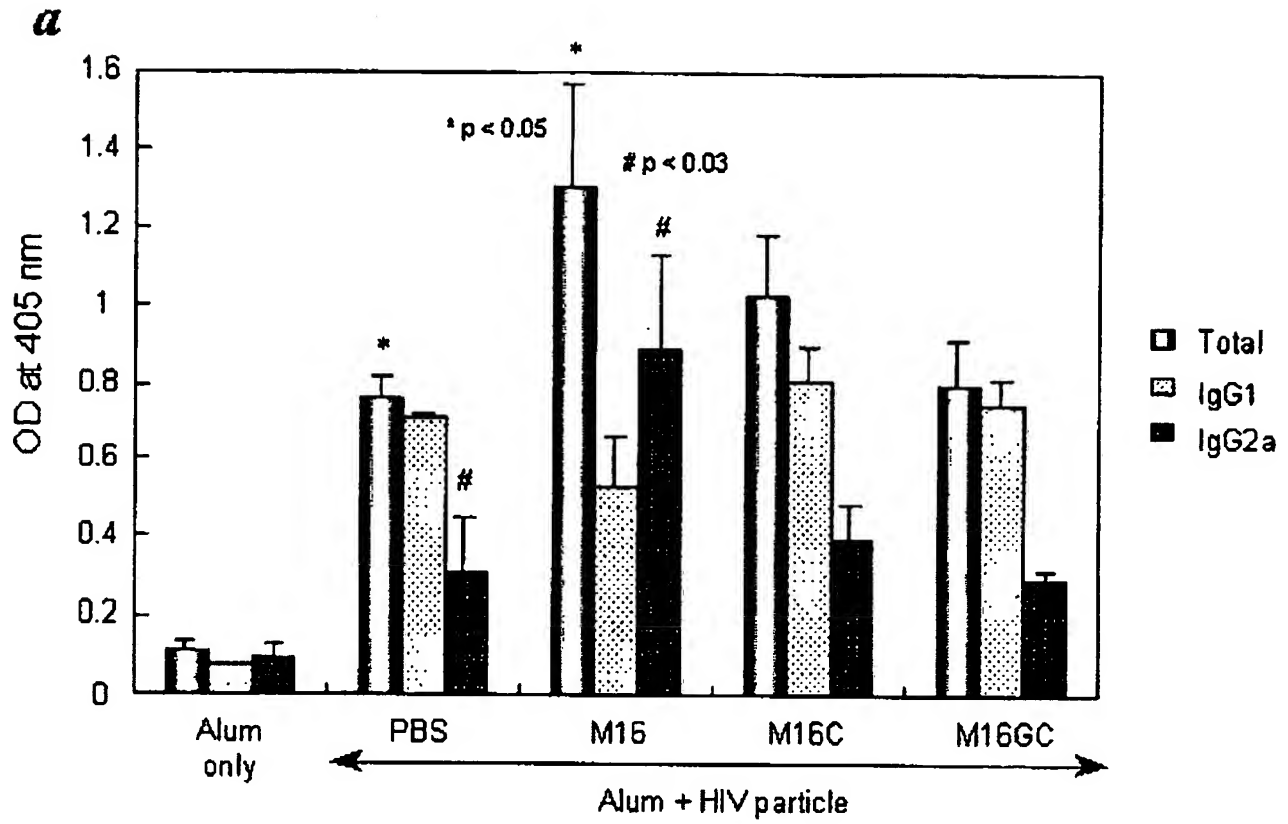




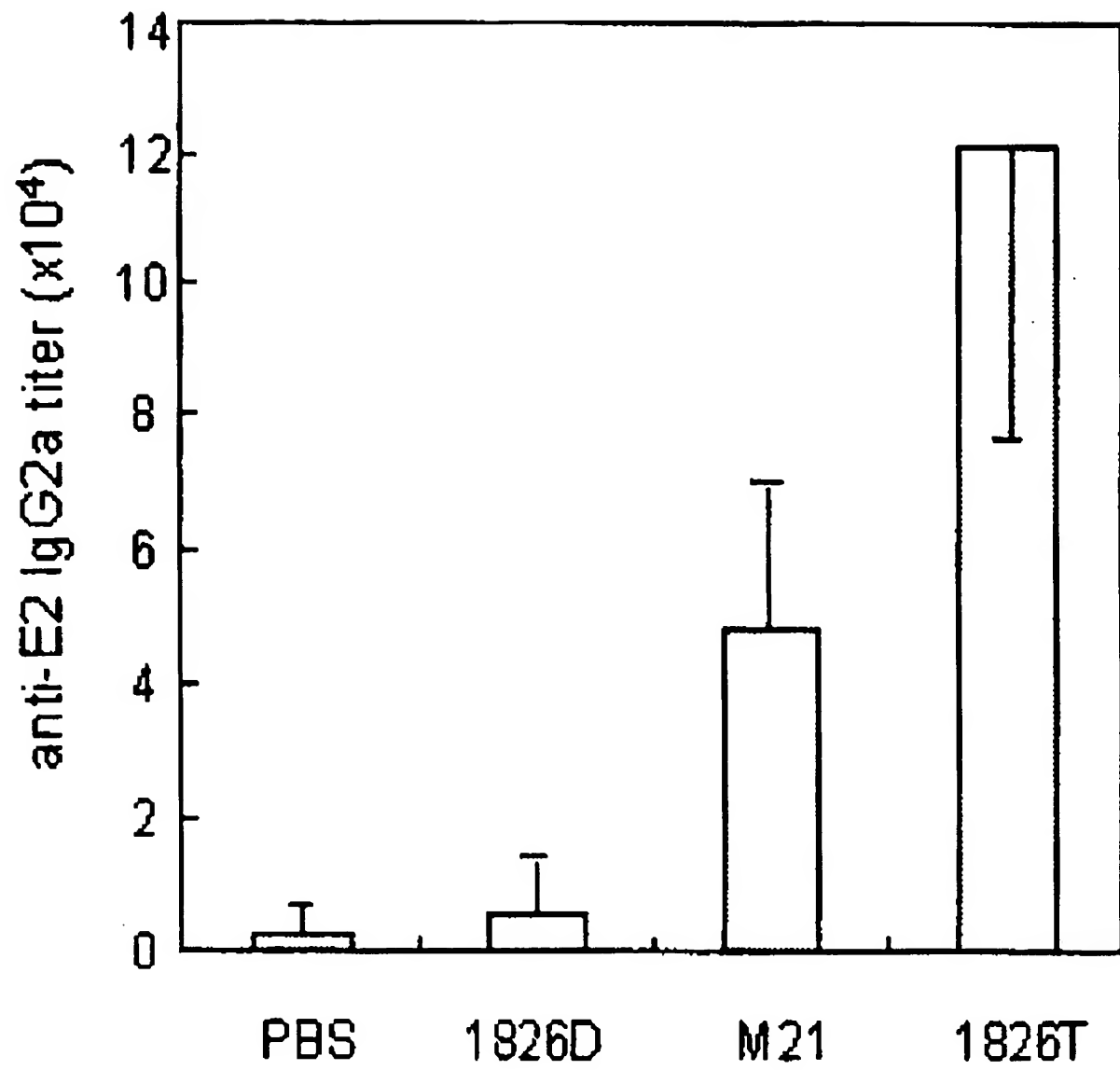
도면 3c



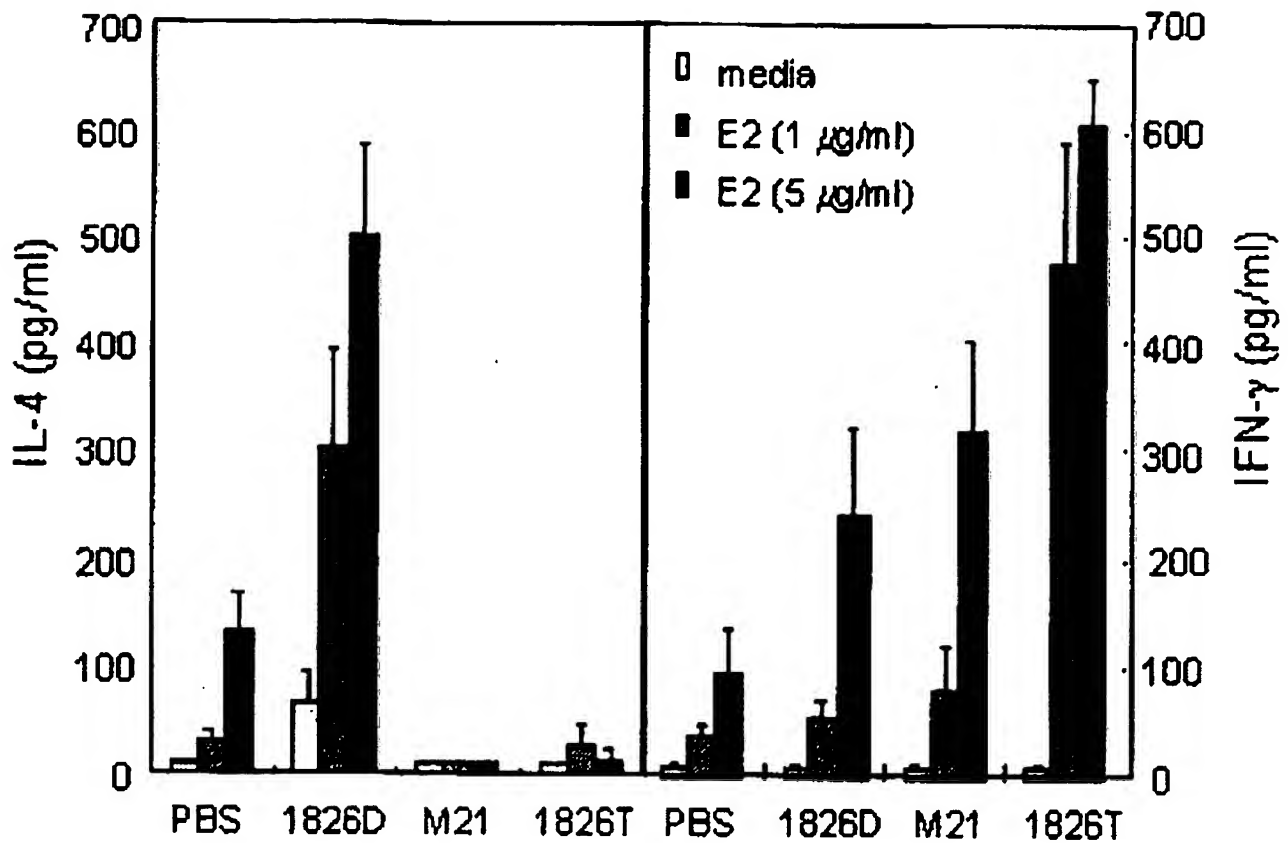
도면 4a



도면 4b



도면 4c



< 110 Genexine Inc.

>

< 120 Modified phosphodiester CpG oligonucleotides conjugated with a dG run which have improved immunomodulatory activity and safety

< 130 9P -11 -26

>

< 160 17

>

< 170 KOPATIN 1.5

>

< 210 1

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 synthetic CpG oligonucleotide with a phosphorothioate backbone

>

< 400 1

>

tccatgacgt tcctgacgtt

20

< 210 2

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 p19

>

which is a phosph oligon havin a CpG motif and a 3

hodie ucleo g

ster tide

putative dG run(GGGGCG correspondin to 2293

). g

2312

of a mpicillin resistant gene derived from pUC 19

< 400 2

>

ggaaaacgtt cttcggggcg

20

< 210 3

>

< 211 14

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 p19d which is a phosphodiester oligonucleotide having a CpG motif

>

< 400 3

>

ggaaaacgtt cttc

14

< 210 4

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M1 which is a phosphodiester oligonucleotide having GpC sequence instead of CpG within the CpG motif of p19

< 400 4

>

ggaaaagctt cttcgggcg

20

< 210 5

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M7 wherein GCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 5

>

ggaaaacgtt cttcgccccg

20

< 210 6

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M13 wherein GGGCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 6

>

ggaaaacgtt cttcgggccg

20

< 210 7

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M14 wherein GGCCCCG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 7

>

ggaaaacgtt ctcggcccg

20

< 210 8

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M15 wherein GGCGCG is conjugated to 3' terminus of p19d

>

< 400 8

>

ggaaaacgtt ctcggcgcg

20

< 210 9

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M16 wherein GGGGGG is conjugated to the 3' terminus of p19d

>

< 400 9

>

ggaaaacgtt ctcgggggg

20

< 210 10

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M19 wherein GG is conjugated to the 5' terminus and GCCC is conjugated to the 3' terminus of p

> 19d

< 400 10

>

ggggaaaacg ttcttcgcc

20

< 210 11

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M26 wherein GG is conjugated to the 5' terminus of 3'CC -deleted M 19

>

< 400 11

>

ggggggaaaa cgttcttcgc

20

< 210 12

>

< 211 20

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M27 wherein GGGGG is conjugated to the 5' terminus of 3'CGCCC -deleted M19

>

< 400 12

>

ggggggggga aaacgttctt

20

< 210 13

>

< 211 26

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M20 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of 1826D

>

< 400 13

>

gggggtcca tgacgttctt gacgtt

26

< 210 14

>

< 211 26

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M21 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of 1826D

>

< 400 14

>

tccatgacgt tcctgacgtt gggggg

26

< 210 15

>

< 211 11

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M12 which is a phosphodiester oligonucleotide having a single CpG motif

>

< 400 15

>

cttaacgttc t

11

< 210 16

>

< 211 17

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M22 wherein dG6 run is conjugated to the 3' terminus of M12

>

< 400 16

>

cttaacgttc tggggg

17

< 210 17

>

< 211 17

>

< 212 DNA

>

< 213 Artificial Sequence

>

< 220

>

< 223 M23 wherein dG6 run is conjugated to the 5' terminus of M12

>

< 400 17

>

ggggggccta acgttct

17